



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CRISTIANE TAMBASCIA PEREIRA

**ESTUDOS FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS SOBRE O TRANSPORTADOR DO
TIPO ABC DE SULFATO EM *Xanthomonas citri***

**FUNCTIONAL AND STRUCTURAL ANALYSIS ABOUT SULFATE ABC
TRANSPORTERS IN *Xanthomonas citri***

Campinas

2017

CRISTIANE TAMBASCIA PEREIRA

**ESTUDOS FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS SOBRE O TRANSPORTADOR DO
TIPO ABC DE SULFATO EM *Xanthomonas citri***

**FUNCTIONAL AND STRUCTURAL ANALYSIS ABOUT SULFATE ABC
TRANSPORTERS IN *Xanthomonas citri***

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade de
Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção
do Título de Doutora em Genética
e Biologia Molecular, na área de
Genética de Microorganismos

Thesis presented to the Institute of
Biology of the University of
Campinas in partial fulfillment of
the requirements for the degree of
Doctor in Genetic and Molecular
Biology, in the area of Genetics of
Microorganisms

Orientadora: Dra. Andrea Balan Fernandes

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
CRISTIANE TAMBASCIA PEREIRA E ORIENTADA PELO DRA. ANDREA BALAN FERNANDES

Campinas

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/16094-4; FAPESP, 2015/26203-0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

P414e Pereira, Cristiane Tambascia, 1983-
Estudos funcionais e estruturais sobre o transportador do tipo ABC de sulfato em *Xanthomonas citri* / Cristiane Tambascia Pereira. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Andrea Balan Fernandes.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 2. Cancro cítrico. 3. Transportadores de cassetes de ligação de ATP. 4. Sulfatos. 5. Regulon. I. Balan, Andrea. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Functional and Structural analysis about sulfate ABC transporter in *Xanthomonas citri*

Palavras-chave em inglês:

Xanthomonas citri subsp. *citri*

Citrus canker

ATP-binding cassette transporters

Sulfates

Regulon

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Andrea Balan Fernandes [Orientador]

Alessandra Alves de Souza

Jörg Kobarg

Adriana Santos Soprano

Rita de Cássia Café Ferreira

Data de defesa: 12-12-2017

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 12 de Dezembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Andrea Balan Fernandes

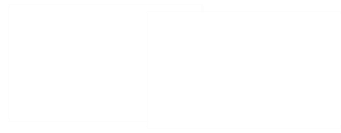
Prof. Dr. Jorg Kobarg

Profa. Dra. Rita de Cassia Café Ferreira

Dra. Alessandra Alves de Souza

Dra. Adriana Santos Soprano

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno



“Se soubéssemos o que era aquilo que estávamos fazendo, não seria chamado de pesquisa”.

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

**Ao Vinícius Pierozzi Tambascia, meu sobrinho e afilhado, que eu possa ser sua maior
incentivadora na sua formação acadêmica.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer minha família: minha mãe **Rosa**, meu irmão **Eduardo** e minha cunhada **Aline** que me incentivaram sempre em todos os aspectos para realização desse doutorado e ao **Vinícius** que me mostrou o quão gostoso é ser tia de um menino sorridente.

Um obrigado especial a **Profa. Dra. Andrea Balan**. Gostaria de escrever muito mais, mas sendo breve: Obrigada por me aceitar como uma mestrande sem nenhuma experiência acadêmica apostando na minha formação aqui no Brasil e lá na Holanda (com um projeto de proteínas de membrana). Sempre me incentivou nos momentos difíceis (e foram vários ao longo desses quase 8 anos). Obrigada por tudo, chefe! Vai ser muito difícil cortar essa relação que ultrapassa a pós-graduação. Será que conseguirei?

Ao Dr. **Américo Ranzani** e à Dra. **Maria Érbia Carnaúba** (*in memoriam*) por compartilharem comigo essa jornada. Ao Américo por toda amizade que transcendeu continentes nesse doutorado. Amigos não acabam na defesa de Tese, como sabemos. À Maria por eu ter o privilégio de conviver com sua filosofia. Obrigada por compartilhar a Utopia. Você fará muita falta!

À **FAPESP** pelo suporte financeiro em toda minha trajetória acadêmica; desde o mestrado, agora pela bolsa de doutorado e a bolsa BEPE.

Ao CNPEM – LNBio por ceder o local de execução do projeto no primeiro ano de doutoramento e ao Instituto de Ciências Biomédicas – USP pelos anos restantes;

Ao Prof. **Celso Eduardo Benedetti**, **Dra. Valéria Abe** e **Jacqueline Silva** pela colaboração nos ensaios funcionais;

Ao Professor Dr. **Luís Carlos Ferreira** e ao Professor **Dr. Gabriel Padilla** por cederem seus laboratórios durante nossa transferência para USP;

À Doutora **Melissa Fessel** e ao Doutor **Alexandre Moutran** pelos desenhos experimentais no início do doutorado;

Ao Professor Dr. **Dirk J. Slotboom** e a Dra. **Joana Santos** por me introduzirem no mundo das “proteínas de membrana” no período de BEPE na Universidade de Groningen – Holanda. Ao professor Dr. **Bert Poolman** para o qual tive a oportunidade de apresentar meu projeto de doutorado. À **Joana, Nynke, Patrícia e Cleia** por serem boas companhias nesse “verão” holandês.

Aos amigos e companheiros de bancada do grupo ABC/LBEAt, LBEAf: e não poderia deixar de citar os amigos e colegas do LNBio e à eterna sala 22 e às diferentes: Meus dados experimentais não teriam a mesma diversão e discussão sem vocês: *Viva à Entropia!* Obrigada! Um agradecimento especial à **Andréia Navarro, Marcelo Barreto e Pamela Pena** pelo companheirismo.

À Msc. **Tereza Lima**, minha inspiradora da clonagem molecular, ao **Dr. Daniel Trindade** pela paciência e divisão do seu conhecimento nos meus momentos de desespero científico. À Dra. **Aline Sampaio** por ler esse manuscrito criticamente.

Aos membros da Banca de Qualificação: Prof. Dr. Jorg Kobarg, Prof. Dr. Claudio Werneck, Dra. Juliana Fattori pelas suas valiosas contribuições e direcionamento do trabalho.

Aos membros da banca de defesa por disponibilizarem seu dia para arguição;

Ao programa de **Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular** e à UNICAMP pela oportunidade e apoio burocrático de obtenção desse título.

À todos que contribuíram diretamente e indiretamente para realização dessa tese, meu muito obrigada!

Este projeto teve seu primeiro ano realizado no Laboratório Nacional de Biociências – LNBio no Centro Nacional de Pesquisas e Energia em Materiais – CNPEM, e os demais no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo. O projeto todo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, número processo 2013/16094-4 e projeto 2015/26203-0 (BEPE).

RESUMO

Xanthomonas citri subsp. *citri* (*X.citri*) é um fitopatógeno causador do cancro cítrico. Esta doença causa importantes perdas para economia brasileira já que o país é um dos maiores exportadores do suco de laranja e não há uma forma efetiva de controle dessa doença. Em *X. citri*, pouco se conhece sobre a captação de íons, incluindo sulfato, elemento essencial para o crescimento celular em todas as formas de vida. Em estudos prévios, foi mostrado que o transportador de alta afinidade do tipo ABC de sulfato e a via de assimilação do mesmo estão completos em *X. citri* e que são ativados durante o crescimento *in vitro* e *in vivo*. Com a finalidade de continuar esses estudos, este trabalho propôs a caracterização funcional e estrutural do transportador ABC de sulfato SbpCysUWA. A análise estrutural foi limitada à proteína periplasmática Sbp, uma vez que as permeases e ATPase não foram expressas mesmo após inúmeras tentativas. O domínio periplasmático Sbp, teve sua estrutura resolvida a 1.14 Å na presença do íon, o que permitiu a caracterização do bolsão de ligação e seus resíduos e análises biofísicas determinaram sua afinidade ao íon. Por outro lado, os estudos funcionais realizados com um mutante de *X. citri* portador de deleção do gene *cysU* (que codifica uma das permeases) e bloqueia o poro de entrada do sulfato mostraram que houve diminuição na produção de goma xantana e xantomonadina, não houve interferência no crescimento bacteriano *in vitro* e nem na formação do biofilme. Adicionalmente, infecções de folhas de cinco variedades de citros mostraram que a deleção afeta o período de infecção, mas não o fenótipo do cancro. Estes dados sugerem que outros transportadores do tipo ABC, de alta afinidade, como os de alcanosulfonados Ssu(1) e Ssu(2), caracterizados pelo grupo neste período, poderiam complementar a carência do enxofre, mas não a captação de sulfato. Adicionalmente, foram identificadas e caracterizadas três proteínas de *X. citri* com função putativa de carreadores de íons, mas de baixa afinidade. Com ensaios de RT-PCR mostramos que os genes de todos estes transportadores são transcritos em meio XAM1 (o qual mimetiza as condições de infecção) e a proteína putativa de captação e regulação de sulfato, Sac1 não é expressa em meio rico LB ON. Estes dados mostram que a bactéria possui e utiliza de todos os seus recursos para manter os níveis de enxofre durante o seu crescimento. Finalmente, este trabalho abriu uma série de perspectivas para futuros estudos sobre estes transportadores, tanto do ponto de vista funcional como estrutural para melhor compreensão da regulação da importação de íons no fitopatógeno.

ABSTRACT

Xanthomonas citri subsp. *citri* is a phytopathogenic bacteria causes citrus canker in citrus. This disease causes important economic losses for Brazil because this country is one of the most exporters for orange juice and does not have effective control disease. *X. citri* has lack information about ion uptake in general, include sulfate, essential element for growth in all types of life. Previous studies described the high affinity sulfate ABC transporter and this assimilation pathway is complete in *X. citri* and activated during growth *in vitro* and *in vivo*. To continue this studies, this work was proposed to characterize, functional, and structural insights for ABC Transporter SbpCysUWA. The periplasmic compound was solved at 1.14 Å with sulfate into the pocket allowing to understand the ligation coordination. On the other hand, functional studies with knockout for Cys U permease reduces gum xanthan production and xanthomonadin but not the ability to grow culture *in vitro*. In addition, leaf infections of five different citrus varieties presented by a deletion, affect the infection period but not the cancer phenotype. These data other high affinity ABC transporters, such as the Ssu (1) and Ssu (2) alkanesulfonates, characterized by the group in the Sulphur starvation in this period. Moreover, were identified three putative sulfate carrier with low ion affinity. RT-PCR data showed this genes is transcripts in LB ON (expresses *sacI* gene) and inducing media XAM1(*in vitro*). These data show that the bacteria uses all its resources to maintain sulfur levels during its growth. Finally, this work has opened a series of perspectives for future studies on these transporters, both from a functional and structural insights.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

6xHisTag - Cauda de seis histidinas

ABC - ATP-Binding Cassette

ATP - Trifosfato de adenosina

Blast - Basic local alignment tool

CD - Dicroísmo Circular

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

C-terminal: Carboxi-terminal

DLS - Espalhamento dinâmico de Luz

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO/ OD - Densidade óptica

EDTA - Ácido etilenodiamino tetracético

ExPASy – Expert Protein Analysis System

FMN - Mononucleotídeo de Flavina

FMNH₂ - Mononucleotídeo de Flavina reduzida

g - Gravidade

IPTG - Isopropil-b-D- tiogalactosídeo

IMAC: Cromatografia de afinidade a metal imobilizado

ITC - Titulação isotérmica calorimétrica

kDa - kiloDaltons

K_a - constante de associação

K_b : Constante de *binding* Constante de Ligação

KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LB - Luria-Bertani

NaCl - Cloreto de Sódio

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NAD(P)H - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NCBI – National Center for Biotechnology Information

N-termina - Amino-terminal

Pb/ bp- pares de base

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PDB - Protein Data Bank

pH - potencial Hidrogeniônico

PMSF – Fluoreto fenilmetilsulfonil

RNA - Ácido ribonucleico

SDS-PAGE: Gel de Poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio

TAQ: DNA-polimerase de *Thermococcus*

T_m – Temperatura média/ Temperatura de Melting – Temperatura de anelamento

Tris - Hidroximetil-aminomanto

μM - micromolar

V - Volts

XGAL - 5-bromo-4cloro-3-inodolil-D-galactopiranosideo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 A importância da economia da laranja e o cancro cítrico.....	16
1.2 <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> : o agente etiológico do cancro cítrico	17
1.3 A captação de nutrientes e o transporte do tipo ABC (ATP-Binding Cassette Transporters).....	18
1.4 Importância do enxofre em bactérias e <i>X. citri</i>	20
1.5 Os sistemas de transporte de sulfato e sulfonatos identificados em <i>X. citri</i>	21
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Identificação das proteínas alvo no genoma bacteriano	26
3.2 Extração de DNA genômico bacteriano	26
3.3 Amplificação dos genes de interesse dos transportadores de sulfato	26
3.7 Produção das proteínas recombinantes para ensaios funcionais e estruturais	29
3.7.1 Produção da proteína ligadora de sulfato Sbp	29
3.8 Ensaios de cristalização e refinamento da proteína Sbp, coleta e processamento dos dados dos cristais.....	30
3.9 Análises dos dados, substituição molecular e refinamento da estrutura da Sbp de <i>X. citri</i>	31
3.10 Titulação calorimétrica isotérmica (ITC) da proteína Sbp na presença do ligante	31
3.11 Fluorescência intrínseca de triptofanos	32
3.12 Testes para produção dos domínios ATPase e transmembrânicos do transportador ABC a partir de diferentes construções	32
3.13 Avaliação do crescimento das linhagens selvagem e mutantes de <i>X. citri</i> em diferentes meios de cultivo.....	32
3.14 Extração de extratos de proteínas totais de <i>X. citri</i>	33
3.15 <i>Western blot</i> para identificação de proteínas recombinantes.....	33
3.16 Produção de bactérias mutantes não polares utilizando o vetor suicida pNPTS138.....	34

3.17	Preparação e transformação de células eletrocompetentes de <i>X. citri</i>	34
3.18	Produção dos mutantes não polares por recombinação homóloga	35
3.19	Análise de sobrevivência e infectividade dos mutantes de <i>X. citri</i>	35
3.19.1	Curva de crescimento em meio rico e meio mínimo M9	35
3.19.2	Avaliação do desenvolvimento do fenótipo do cancro cítrico em folhas de <i>Citrus sinensis</i> após infecção com <i>X. citri</i> e mutante <i>Xac::cysU</i> utilizando o método de injeção ..	36
3.19.3	Avaliação do desenvolvimento do fenótipo do cancro cítrico em folhas de <i>Citrus sinensis</i> após infecção com <i>X. citri</i> e mutante <i>Xac::cysU</i> utilizando o método de perfuração por agulha (<i>pinprick</i>)	36
3.19.4	Ensaio de quantificação da produção de goma xantana	36
3.19.5	Extração de pigmentos totais para quantificação do pigmento xantomonadina	37
3.20	Extração de RNA e construção de cDNA a partir de linhagens de <i>X. citri</i> selvagem ..	37
3.21	Monitoramento da expressão dos genes putativamente envolvidos na captação de sulfatos em <i>X. citri</i>	37
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Efeito da deleção do gene <i>cysU</i> em <i>X. citri</i>	39
4.2	Análise do efeito da deleção no gene <i>cysU</i> na infecção e fenótipo do cancro <i>in vivo</i> ...	42
4.3	Outros sistemas de captação de íons (sulfato) em <i>X. citri</i>	47
4.3.1	Proteína reguladora de resposta a sulfato: Sac1 de <i>X. citri</i>	48
4.3.2	Proteínas carreadoras do tipo SLP in <i>X. citri</i> : YbaR e YchM	54
4.4	Caracterização das proteínas do transportador de sulfato de <i>X. citri</i>	60
4.4.1	O modelo do transportador CysUWA	61
4.4.1	A proteína ligadora periplasmática Sbp	63
4.4.2	Produção das permeases e ATPase do transportador de sulfato de <i>X. citri</i> para estudos estruturais	70
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	74
6.	REFERÊNCIAS	76
	ANEXO 01- The sulfur/sulfonates transport systems in <i>Xanthomonas citri</i>	81

ANEXO 02- Sulfate-Binding Protein (Sbp) from <i>Xanthomonas citri</i> : Structure and Functional Insights.	83
ANEXO 03- Structural and physiological analyses of the alkanesulphonate-binding protein (SsuA) of the citrus pathogen <i>Xanthomonas citri</i>	103
ANEXO 04- Declaração Isenção de Comitê de Ética	118
ANEXO 05 - Declaração de Direitos Autoriais	120

1. INTRODUÇÃO

1.1 A importância da economia da laranja e o cancro cítrico

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de laranja, responsável por 34% da produção dos frutos e por aproximadamente 50% do suco produzido mundialmente. O estado de São Paulo, em particular, aparece em destaque como um dos maiores parques citrícola mundiais [1].

A disseminação e potencial de impacto de pragas na economia da laranja, comprometem a produtividade e exigem investimentos[1]. Miranda e Ximenes (2009) relatam que a citricultura no Brasil tem vários desafios com relação às pragas e datam a chegada do cancro cítrico aos pomares brasileiros em 1957. Esta é uma das doenças mais importantes no cultivo de citros, haja visto que sua erradicação e prevenção se dá apenas com a remoção completa de plantas contaminadas [2, 3] .

A atual legislação sobre o cancro cítrico (instrução normativa nº 37) oficializada em 5 setembro 2016, pelo MAPA e que entrou em vigor a partir do dia 4 de março desse ano, permite a presença de plantas com cancro cítrico nos pomares, diferenciando-se das normas anteriores na qual havia a obrigatoriedade da a erradicação das plantas doentes. O que permitiu que os produtores não serão mais penalizados devido à presença de plantas com cancro cítrico nas propriedades, mas sim caso ocorra a comercialização de frutos com sintomas da doença. Os sintomas do cancro cítrico começam com pequenas lesões circulares nas folhas que vão se espalhando ao longo do tempo tornando-se proeminente e evidenciando pela cancrese característica (Figura 1). Esses sintomas podem ser observados em folhas, ramos e frutos [4]. Em condições avançadas, a doença pode acarretar em queda prematura dos frutos. A principal característica da doença é a hiperplasia e hipertrofia dos tecidos que chegam a romper-se e assim aumentam a disseminação do patógeno [4, 5].

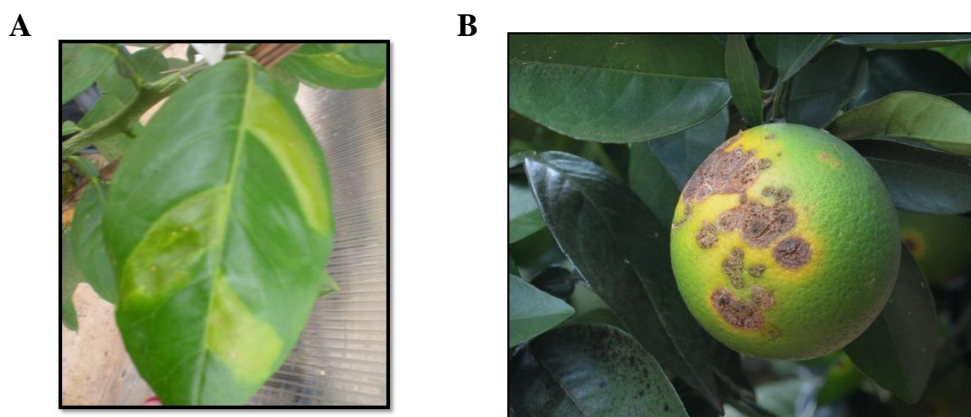


Figura 1 - Perfil do cancro cítrico em hospedeiros. A) Folha de *Citrus sinensis* (laranja pera) infectada com *Xanthomonas citri* por 14 dias. As manchas amarelas são indicativas do desenvolvimento da doença[6] **B)** O perfil do cancro cítrico em laranja doce (RETIRADO de [7]).

1.2 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: o agente etiológico do cancro cítrico

Os citros são infectados por patógenos capazes de penetrar e colonizar o tecido do hospedeiro. *Xanthomonas axonopodis* patovar *citri* 306, renomeada como *Xanthomonas citri* sp. *citri* (*X. citri*) [8, 9], é o agente etiológico do cancro cítrico. Dentre as variadas espécies do gênero *Xanthomonas* que causam o cancro, esta é responsável pela cancrose mais severa ou tipo A em *Citrus sinensis* e outras variedades [4].

Com relação à morfologia/fisiologia bacteriana, *X. citri* é uma bactéria gram-negativa com flagelo polar, aeróbia quimiotrófica restrita, não fixadora de nitrogênio que utiliza açúcares como fonte de carbono [10]. Suas colônias são de aspecto amarelado característico, decorrente da produção de um pigmento carotenoide denominado xantomonadina, muito utilizado para identificação do gênero *Xanthomonas* [11] juntamente com a goma xantana, um polissacarídeo de importância fundamental para o processo de infecção e patogênese que também é utilizado na indústria alimentícia como espessante [12]. Em 2002, da Silva e colaboradores sequenciaram o genoma desse patovar, o qual possui mais de 4000 genes e pouco mais de 60% do genoma anotado com funções putativas [13]. Este marco trouxe novas perspectivas para o entendimento e importância dos grupamentos gênicos nos mecanismos de patogênese. Vários genes relacionados à adesão, secreção de proteínas e enzimas de degradação da parede celular foram identificados, e vários trabalhos demonstraram a relação destes genes com a patogênese. Entender os mecanismos moleculares envolvidos para sucesso da infecção é de grande importância para propor medidas efetivas para o controle da doença [14].

A adesão no hospedeiro em superfície é o primeiro passo para formação do biofilme e progressão do processo infeccioso. Este o inicia-se com interações físico-químicas não específicas, muitas vezes por quimiotaxia evoluem para que a partir da adesão de células bacterianas, ocorra super expressão e liberação dos reguladores. Mediante aumento da população bacteriana, moléculas efetoras vão se acumulando e inicia-se a transcrição de genes regulatórios para motilidade, virulência e exopolissacarídeos (EPS), obtêm-se a formação do biofilme. Há também a comunicação entre bactérias patogênicas para regulação de processos metabólicos em alta densidade bacteriana denominado de *quorum sensing* (QS) [15]. Todos os estágios de formação do biofilme como a liberação de genes relacionados com divisão celular, remodelamento de parede e tráfego de vesículas, ocorrem em *X. citri* [16, 17]. Este processo, encontrado tanto *in vivo* quanto *in vitro*, é essencial para formação de micro-colônias e formação de estruturas mais complexas dispostas de forma hexagonal separadas por uma rede canais [17].

Por conta da rápida difusão de *X. citri* nos pomares dos mais variados citros, grandes investimentos têm sido feitos na tentativa de aumentar o entendimento da fisiopatologia do organismo e prevenir sua propagação [5]. Estudos recentes descrevem algumas alternativas baseadas em compostos orgânicos para mecanismos de inibição da divisão celular e proliferação bacteriana [14, 18], mas nenhuma medida foi efetivada até o presente trabalho.

1.3 A captação de nutrientes e o transporte do tipo ABC (ATP-Binding Cassette Transporters)

Para adquirir a quantidade necessária de nutrientes, principalmente para o processo de adaptação e manutenção da patogênese e virulência no hospedeiro, as bactérias sentem e respondem aos mais diversos ambientes [19, 20]. Diversos grupos de proteínas transportadoras mantêm o tênue equilíbrio do transporte através da membrana celular [21]. Particularmente, os transportadores do tipo ABC (do inglês *ATP-Binding Cassette*) são sistemas de transporte ativo constituintes de uma das maiores e mais importantes famílias de proteínas de membrana distribuídas nos três domínios da vida; arqueas, bactérias e eucariotos [22]. Estes sistemas são capazes de reconhecer os mais variados tipos de nutrientes, transportar (incorporação/extrusão) diferentes moléculas, efetuar a manutenção do volume celular, e também conferir resistências a antibióticos e outras drogas [23].

Os transportadores do tipo ABC são classicamente separados em dois grandes grupos: exportadores e importadores (aparentemente exclusivos de procariotos) (Figura 2). Ambos

usam a hidrólise do trifosfato de adenosina (ATP) para o transporte ativo na membrana citoplasmática. A estrutura organizacional comum destes transportadores é formada por duas permeases que formam o poro de passagem na membrana (Figura 2, laranja e amarelo) e duas ATPases que geram energia para o transporte (Figura 2 azul e ciano). No caso de importadores tipo I e II, uma proteína periplasmática adicional é responsável pela captação do substrato (Figura 2, em magenta) [23] que pode variar desde pequenas moléculas como íons até açúcares e peptídeos. As proteínas periplasmáticas, como também são chamadas em bactérias gram-negativas, têm papel fundamental em relação à especificidade e afinidade dos substratos que serão transportados [24]. Estas proteínas apresentam, em geral, baixa identidade de sequência de aminoácidos mas conservam a estrutura terciária [24, 25].

Estruturas tri-dimensionais de diferentes transportadores (exportadores e importadores) são disponíveis em alta resolução e múltiplas conformações, o que tem permitido a elucidação da mecanística do transporte [26-28] [23, 29-36].

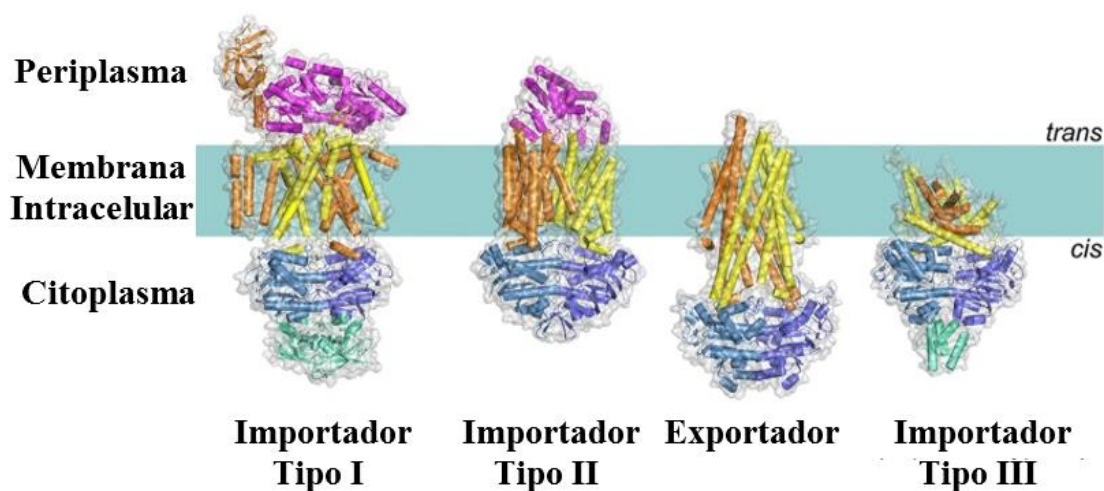


Figura 2 – Super família dos transportadores do tipo ABC em bactérias Todos os grupos compartilham os dois domínios ATPases (NBD) (verde e azul) anexados a dois domínios transmembrânicos (TMD) (laranja e amarelo). No tipo I e II dos importadores, há a presença da proteína ligadora de substrato (que em bactérias gram-negativas encontram-se no periplasma ou externamente, em bactérias gram-positivas) (magenta). Os exportadores só apresentam os domínios NBD e TMD assim como os importadores do tipo III. Alguns apresentam domínio regulatório (verde) na porção C-terminal (CDR). RETIRADO E ADAPTADO de [33].

Os domínios transmembrana ou permeases são os mais diversificados nos diferentes transportadores, apresentando-se com 6 a 20 hélices transmembrana, podendo ser homo- ou heterodiméricos. São responsáveis pela interação com as ATPases e sinalização para a hidrólise do ATP por meio de uma alfa-hélice citoplasmática, chamada de *coupling helix* (hélice de associação). Por outro lado, as ATPases ou são os componentes mais conservados,

com domínios e motivos bem característicos que podem ser usados para a identificação dos transportadores em genomas. A sequência LSSGQ, por exemplo, é a assinatura de identificação de permeases de transportadores do tipo ABC [23].

A relevância funcional dos transportadores ABC na infectividade e patogênese bacteriana também têm sido extensivamente estudada uma vez que estes sistemas transportam para dentro ou fora da célula uma série de diferentes compostos o que afeta funções diversificadas como evasão, resistência ao hospedeiro, fatores de superfície celular e excreção, auxílio na captação de nutrientes, entre outros [22]. A compreensão detalhada de etapas do transporte e atividade dos transportadores ABC no metabolismo são passos preliminares para a utilização dos mesmos como alvos para a terapêutica antimicrobiana, o desenvolvimento de vacinas e defensivos agrícolas [22, 37, 38]. A primeira descrição da contribuição de um transportador ABC na virulência de um fitopatógeno foi relacionada ao transportador de glicose e galactose de *Agrobacterium tumefaciens* por meio do componente periplasmático ChvE, uma proteína que participa da quimiotaxia e indução de genes de virulência em resposta aos monossacarídeos que ocorrem na planta [37]. Em relação aos transportadores de íons, o papel do transportador de fosfato (sistema PstSUWA) tem sido relacionado à capacidade de adesão e crescimento de *Streptococcus mutans* em superfícies abióticas [39], como também relacionado com a infecção e produção de goma xantana em *X. citri*, afetando indiretamente a infecção bacteriana [40, 41], entre muitos outros.

1.4 Importância do enxofre em bactérias e *X. citri*

O enxofre é o quarto elemento mais abundante do planeta [42] e faz parte da composição de inúmeras biomoléculas como cisteína e metionina, co-fatores: S-adenosil metionina, CoA, biotina, ácido lipóico, tiamina, clusters de ferro, metabólitos: penicilina e glutatona [43], sendo um elemento essencial para o desenvolvimento de doenças e patogênese [44]. A análise do genoma de diferentes microrganismos tem mostrado que os genes envolvidos com a captação de sulfato são conservados, incluindo em *X. citri*. Na sua forma reduzida, o enxofre é usado na biossíntese de metionina e cisteína. Cisteína é incorporada em proteínas, coenzimas e outras. Em *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* e *Bacillus subtilis* [45], a assimilação do enxofre pode ocorrer pelas vias de captação de sulfato, tiosulfato, alceno sulfonatos e sulfonatos alifáticos, compreendendo ao todo 26 genes que constituem o regulon *cys*. Este regulon inclui os genes codificadores de três transportadores

ABC com as respectivas enzimas de óxido-redução dos substratos. Ainda, o transportador ABC de sulfato e a via de redução do íon a sulfito (genes *cysCDNHIJKMG*), tem sido amplamente estudados em outras bactérias [46, 47] e apontados como potencial alvos para desenho de drogas em microrganismos e protozoários [48-50], uma vez que são comprovadamente envolvidos no crescimento e patogênese [44, 51-54]. Sassetti e colaboradores [55] demonstraram que os genes da via de assimilação de compostos sulfonados são essenciais para o desenvolvimento de espécies do gênero *Mycobacterium*. Uma linhagem mutante de *M. tuberculosis* que possui deletado o gene correspondente à proteína ligadora de sulfato (*subI*; 30.8% de identidade com o órtologo de *X. citri*), não cresce em meio mínimo e apresenta crescimento altamente reduzido em meio rico [56].

1.5 Os sistemas de transporte de sulfato e sulfonatos identificados em *X. citri*

Conforme evidenciado para *E. coli*, nosso grupo demonstrou que *X. citri* apresenta, pela primeira vez, a grande maioria dos genes putativos relacionados ao regulon *cys* (Figura 3) [57]. O artigo completo, contendo toda metodologia e discussão encontra-se no ANEXO1.

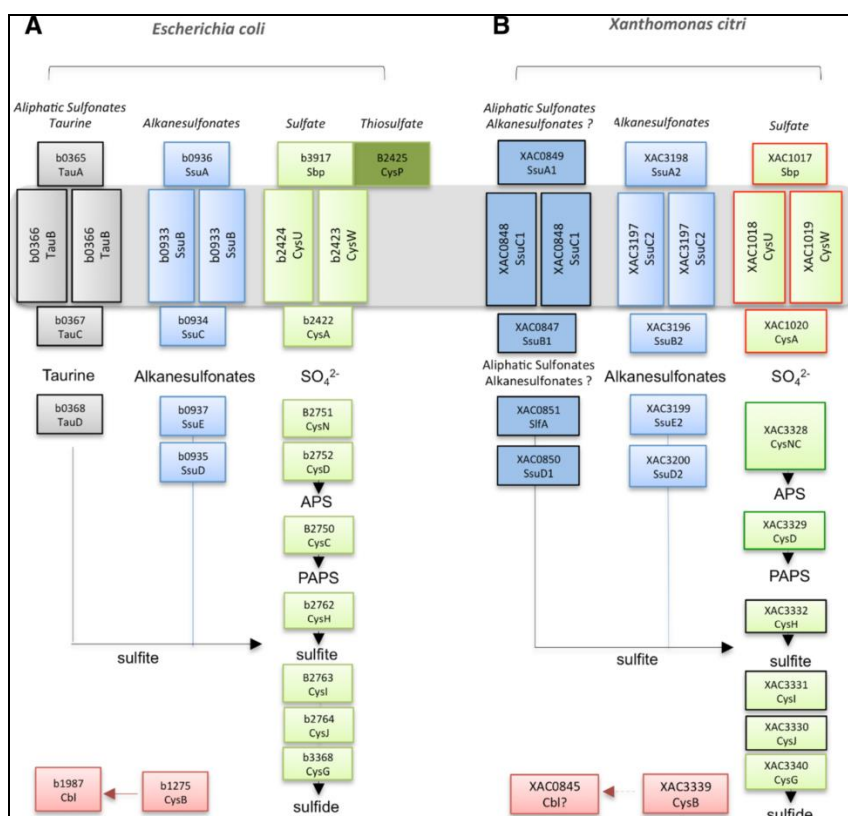


Figura 3 - Esquema geral dos genes do regulon *cys* de *E. coli* e ortólogos previstos identificados no genoma de *X. citri*. (A) Genes do regulon *cys* de *E. coli*. (B) Possíveis ortólogos encontrados em *X. citri*. Caixas verdes indicam os genes da via de capturação e assimilação de sulfato (SO₄²⁺), sistema

de captação responsável pela ligação e redução de sulfato a sulfito. Linhas da mesma cor nas caixas de *X. citri* (em vermelho, verde e preto) representam genes que possivelmente pertencem ao mesmo operon. CysP, identificado apenas em *E. coli*, é o componente periplasmático de captação de tiosulfato que utiliza o mesmo transportador de sulfato. Caixas azul claro indicam os genes que são descritos para o transporte e assimilação de alceno sulfonatos. Com base na identidade de sequência e de modelagem molecular, o transportador de taurina e TauD da via de *E. coli* (mostrados em cinza) não foram identificados em *X. citri*, mas parecem ser substituídos por outros homólogos putativos dos sistemas de captação de alceno sulfonatos ou sulfonatos alifáticos e enzimas óxido-redutoras (SsuD1 e SlfA, respectivamente) (mostrado em azul escuro). As caixas vermelhas mostram os genes regulatórios, *cysB* e *cbl*. Todos os genes são identificados pelo seu código KEGG e quando presente, o nome da proteína putativa. P: espaço periplasmático, IM: membrana interna, C: citoplasma (RETIRADO de Pereira et al., 2015).

Brevemente, fazem parte deste regulon os responsáveis pela codificação do transportador ABC de sulfato SbpCysAUW, altamente conservado. Uma vez que a captação de sulfato seria finalizada, as proteínas CysNCDH teriam como função reduzir-no para sulfito, e em seguida, o complexo CysGIJ reduziria o íon para sulfeto. Adicionalmente, ainda foram identificados dois outros sistemas do tipo ABC associados ao transporte de alcanosulfonatos: os sistemas SsuABCD(1) e SsuABCDE(2). Análises de bioinformática e a resolução da estrutura da proteína SsuA2 na presença de diferentes alcanosulfonatos [6] revelaram que SsuABCD(2) seria o transportador ortólogo do sistema SsuABC de *E. coli*, responsável pela captação e transporte de alcanosulfonatos. Por outro lado, o segundo sistema codificado pelos genes *ssuABC(1)* não mostrou nenhuma similaridade com o transportador de taurina, incluindo as análises do bolsão de ligação. Mais recentemente, Sampaio e colaboradores (2017), em estudos do sistema de transporte do tipo ABC NrtTBCA, putativamente relacionado ao transporte de nitrato, mostrou que a proteína ligadora NrtT seria outra ligadora de alceno sulfonatos, com capacidade de ligar taurina e MOPS. Interessantemente, a deleção do gene *nrtT* induziu um fenótipo do cancro atenuado, muito similar ao observado no mutante de *ssuA2*. Ambos os mutantes mostraram a diminuição da produção de goma xantana [6, 58]. Com este sistema adicional, *X. citri* teria ao menos 3 sistemas dedicados à captação de alceno sulfonatos, indicando fortemente a relevância destes compostos para a bactéria. De fato, a transcrição da maioria dos genes envolvidos nos sistemas de transporte mencionados e das enzimas associadas foi mostrada em condições que simulam as condições de infecção na planta (Figura 4). Ainda, em mutantes de *X. citri* portadores de deleção nos genes correspondentes às proteínas ligadoras periplasmáticas de alceno sulfonatos, nosso grupo demonstrou que tais sistemas são importantes em vários processos celulares como produção de goma xantana, adesão, formação de biofilme, infecção em *Citrus sinensis* e desenvolvimento do cancro cítrico [6, 58].

A comparação estrutural das proteínas ligadoras periplasmáticas SsuA1, SsuA2, e Sbp, baseada nas estruturas disponíveis, modelagem molecular e na análise de sequências, tem mostrado que os bolsões de SsuA1, SsuA2 e NrtT somente conservam o sítio de atração e possível interação com o sulfato dos alceno sulfonatos, mas diferenciam-se largamente no restante, indicando diferentes ligantes. Para completar a lista das proteínas que pertenceriam ao regulon *cys*, em *X. citri*, ainda foi identificado o gene *cysB* que em *E. coli* codifica um ativador transcricional do tipo LysR [59]. A proteína CysB é a reguladora para a assimilação de enxofre enquanto outra proteína, Cbl, funciona como um elemento acessório específico para a utilização de enxofre a partir de fontes organoenxofres, ativando a expressão dos genes *tau* e *ssu*, porém essa última não foi identificada no genoma de *X.citri*, sugerindo assim a regulação do *cys* regulon apenas por CysB [57].

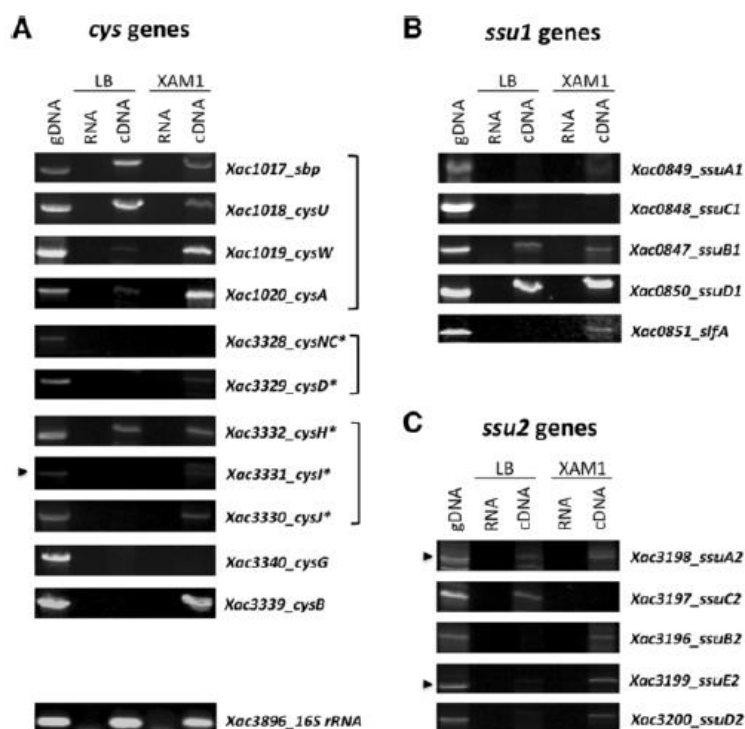


Figura 4. Análises de RT-PCR dos genes codificadores dos transportadores dedicados ao transporte de compostos sulfonatos e enzimas associadas. (A) Genes pertencentes a via de transporte e assimilação de sulfato do regulon *cys*; (B) genes dos operons *ssu1* e (C) *ssu2* dos transportadores e enzimas de sulfonatos. O RNA total foi extraído de células crescidas em meio LB e XAM1 durante a fase exponencial de cultivo. gDNA: DNA genomic (100 ng); cDNA: DNA complementar (200 ng); RNA: controle negativo. Genes são descritos de acordo com o número seguido pelo nome como evidenciado pelo banco de dados KEGG. (*) proteínas identificadas em análises de proteoma [26]. Como controle é mostrado o fragmento de 271 bp do 16S rRNA. A seta indica a massa molecular esperada de cada transcrito. RETIRADO DE [57].

Com base nestas análises prévias e nas muitas questões levantadas sobre a funcionalidade dos sistemas mencionados, o objetivo deste trabalho é caracterizar o papel funcional e a estrutura do sistema de transporte de sulfato em *X. citri*.

2. OBJETIVOS

Caracterização funcional e estrutural das proteínas envolvidas no transporte de sulfato em *X. citri* com ênfase nos transportadores do tipo ABC e sua relação com o crescimento bacteriano, formação de processos infecciosos e patogênese bacteriana.

Para alcançarmos os objetivos gerais, objetivos específicos foram divididos em:

Análises Funcionais:

- Construção de um mutante de *X. citri* portador de deleção de um gene ou mais genes do transportador;
- Infecção de folhas de *Citrus sinensis* com as linhagens mutantes e selvagem para avaliação do crescimento, infecção e indução do fenótipo do cancro cítrico;
- Avaliação da importância da deleção dos componentes do transportador na produção de goma xantana e formação de biofilme;

Análises Estruturais:

- Caracterização estrutural e funcional das proteínas do transportador do Tipo ABC: Sbp, permeases CysU e CysW e ATPase CysA por meio de produção de proteínas heterólogas em *E. coli*;
- Purificação das proteínas por técnicas cromatográficas;
- Ensaios biofísicos de Dicroísmo circular, fluorescência, calorimetria, para caracterização das proteínas;
- Testes de cristalização e subsequente determinação da estrutura tridimensional da proteína Sbp e/ou do transportador completo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Identificação das proteínas alvo no genoma bacteriano

Todas as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos das proteínas de interesse neste trabalho foram obtidas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A busca por ortólogos das proteínas e sequências foi feita com o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e KEGG2, do Instituto Central de Bioinformática para investigação em Química da Universidade de Kyoto (www.genome.jp). Todas estão identificadas na Tabela 01 abaixo.

Tabela 1 - Características dos genes e respectivas proteínas da via de captação de sulfato de *X. citri* usados como alvo neste projeto. Dados obtidos no servidor KEGG

Proteína	Gene	Função anotada	No. de Nucleotídeos	No. resíduos de aa	Classificação enzimática
SBP	xac1017	Ligadora de Sulfato	1017	338	via xac02010
CysU	xac1018	Permease Sulfato	861	286	via xac02010
CysW	xac1019	Permease Sulfato	954	317	via xac02010
CysA	xac1020	ATPase do transportador de Sulfato	1038	345	3.6.3.25

3.2 Extração de DNA genômico bacteriano

O DNA genômico de *X. citri* foi extraído com kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega – USA) para bactérias gram-negativas, conforme instruções do fabricante.

3.3 Amplificação dos genes de interesse dos transportadores de sulfato

Para amplificação dos genes de interesse, os oligonucleotídeos inicial e final foram desenhados a partir das sequências gênicas disponibilizadas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Às sequências foram adicionados sítios de restrição para subclonagem em vários vetores de expressão, conforme estratégia utilizada para cada gene. Todos os oligonucleotídeos/iniciadores usados neste trabalho estão apresentados na Tabela 2. As reações de amplificação padrão para Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction* - PCR) estão descritas na Tabela 3. Os resultados foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% com Gel Red (Biotium – USA) e sistema de fotodocumentação UVP. Após confirmação do êxito da reação, as bandas do gel foram

extraídas e purificadas com Kit de purificação de PCR ou Gel Extraction (Qiagen), ambos seguindo as instruções do fabricante.

Tabela 02 – Lista dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesse trabalho e fragmentos amplificados.

Nome	Sequencia dos Oligonucleotídeos	Vetor
cysuwa_XbaI_RBS_10H_F	GATAGTCTAGAAGGAGGAATTAACCATGATGCATCATCATCACC ATCACCACCACCACATGTCGATGTCGGTTGCACCTCA	pET28a
cysuwa_XhoI_PET28A_R	GTAGTACTCGAGTTACGCGGGAAATATCCCGTACTGCCGTGCTG	
F_F1RΔ sbp_HindIII	GATCGAAGCTTTTTTTGCGCCAGCGGTGCGTCG	pNPTS138
R_F1R1Δsbp_NdeI	GATGCCATATGTGTCACGACGATCTCCTGGCCGGTTGAGC	
F_F2R2Δsbp_NdeI	GATCCATATGCCAACAAGTAAGCGATGTCGATGTCGGTTGC	pNPTS138
R_F2R2Δsbp_BamHI	ATCGGATCCTCATACGGGCTGCGTTGATAGCGC	
cysuwa_HinDIII_R	GCAAGCTTTTACGCGGGAAATATCCCGTACTGCCGTG	pBAD24
cysuwa_XbaI_HIS_F	GCTCTAGAATGCACCACCACCATCACCATCATCATATGTCGATGTCG GTTGCACCTCACCC	
R4_pBAD24_USER	ACCACCACCAUCACCATCATCATATGTCGATGTC	pBAD24
F3_pBAD24_USER	AGCTTGCTGUTTTGGCGGATGAGAGAAG	
F1_cysuwa_USER	ACCACCACCAUCACCATCATCATATGTCGATGTC	pBAD24
R2_cysuwa_USER	ACAGCCAAGCUTTTACGCGGGAAATATCCCGTAC	
F_F1R1Δ cysu_HindIII	AAGCTTAACGATCACGGTGGCATAACCAC	pNPTS138
R_F1R1Δ cysu_NdeI	CATATGTGCAACCGACATCGACATCG	
F_F2R2Δ cysu_NdeI	CATATGCGCTATCAACGCAGGCCCGTATG	pNPTS138
R_F2R2Δ cysu_BamHI	GGATCCTCGTCGCCGAACAGCACCTGC	
F_F1R1Δ cysuw_HindIII	AAGCTTAACGATCACGGTGGCATAACCA	pNPTS138
R_F1R1Δ cysuw_NcoI	CATATGTGCAACCGACATCGACATCGC	
F_F2R2Δ cysuw_NcoI	CATATGCGCTATCAACGCAGGCCCGTATG	pNPTS138
R_F2R2Δ cysuw_BamHI	GATCCATATGCCAACAAGTAAGCGATGTCGATGTCGGTTGC	
F_cysA_pET28a_BamHI	GTGTGGGATCCGTGACCATGGGCATCCGCATTAC	pET28a
R_cysA_pET28a_XhoI	GTGCTCGAGTTACGCGGGAAATATCCCGTACTG	
F_cysA_pHAT2_EcoRI	GTGGAATTCGTGACCATGGGCATCCGCATTAC	pHAT2
R_cysA_pHAT2_HindIII	GTGAAGCTTTTACGCGGGAAATATCCCGTACTGCC	
F_cysA_pACYC_EcoRI	GCCGAATTCCCGTGACCATGGGCATCCGC	pACYC
R_CysA_pACYC_BamHI	GGCGGATCCCGCAAATATCCCGTAGTCCCG TG	
F_confmut_uw	GACATCGCGCGGTTTCCGGAG	pHAT2
R_confmut_uw	CAGGCGGTGAATGCGGATGC	

F_cysA_pBAD24_EcoRI	GTGGAATTCGTGACCATGGGCATCCGCATTAC	pBAD24
R_cysA_pBAD24_HindIII	GTGAAGCTTTTACGCGGGAATATCCCGTACTGCC	
F_CysA_BamHI	ATATAGGATCCATGACTATGGGTATTCGTATCCATCGTC	pHAT2
R_CysA_HindIII	ATATAAAGCTTTTCATGCCGGAAGATACCATACTGACGG	
F_cysU_BamHI	ATATAGGATCCATGTCTATGTCTGTAGCTCCGCATC	pHAT2
R_cysW_HindIII	ATATAAAGCTTTTCAGTGACGGTGGTTAGCTGCCAGAGAATC	
F_cysU_NdeI	ATATACATATGTCTATGTCTGTAGCTCCGCATC	pKLC1
R_cysW_BamHI	ATATAGGATCCTCAGTGACGGTGGTTAGCTGCCAGAGAATC	

Tabela 03 – Reação de amplificação (PCR) padrão para *X. citri*

Reagentes	Volume
DNA Genômico/ 100ng	1 uL
Tampão 10x	5 uL
Cloreto de Magnésio/50mM	1 uL
DNTP mix/ 10mM	1-2 uL
Primer F 10uM	2 uL
Primer R 10uM	2 uL
DMSO 100%	2,5 uL
Taq Dna Polimerase / 5U/uL	0,5 uL
H2O Milliq	Q.S.P 50 µL
Reação Final	50 uL

3.4 Ligação no vetor de clonagem pGem® T-Easy

Após o produto da PCR ser purificado e ter sua quantidade estimada em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific- USA), seguiu-se a reação de ligação conforme instruções do fabricante. A reação foi realizada a 4°C durante 18 horas.

3.5 Transformação de células de *E. coli* termocompetentes e confirmação de clonagem

As células de *E. coli* DH5α termocompetentes contendo pGEM+fragmento de PCR foram transformadas segundo Sambrook e colaboradores (2001). As colônias crescidas em

placa de meio LB com ampicilina após 18 horas de incubação tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos e analisados quanto à presença do inserto através de clivagem com enzimas de restrição específicas. As reações foram realizadas de acordo com instruções dos fabricantes das enzimas Fast Digest (Thermo Scientific - USA). As clonagens foram confirmadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8 % e as amostras positivas após a análise de restrição, foram sequenciadas no Laboratório de Sequenciamento de DNA do LNBio (CNPEM, Campinas) ou do Centro de Estudos de Genoma Humano na Universidade de São Paulo (USP, São Paulo)..

Devido às inúmeras tentativas de expressão dos componentes de membrana do transportador e ATPase, sem sucesso, solicitamos a clonagem dos respectivos genes utilizando o codon usage para *E. coli*. As construções foram realizadas pela empresa GeOne (Brasil-Br) em vetor pBLUEScript. Todas as etapas de sub-clonagem são apresentadas na etapa seguinte.

3.6 Sub-clonagem no vetor de Expressão de interesse

Para a sub-clonagem nos vetores de expressão pET28a, pETDuet, pBAD24 e pKLC1 os insertos dos alvos deste trabalho foram clivados do pGEM-TEasy ou pBLUESCRIPT utilizando as respectivas enzimas de restrição (Tabela 2). Como padrão, para a clivagem dos vetores de expressão e dos fragmentos em pGEM-TEasy foram utilizados 2 µg do vetor, 1 µg do inserto, 10 unidades de cada enzima do sítio de clonagem e tampão específico para enzimas. As reações foram mantidas em banho seco a 37°C por 2 horas. Após análise em gel de agarose 0,8 % os insertos e os vetores foram purificados de acordo as instruções do Kit Gel Extraction (Qiagen – USA). A ligação dos insertos no vetores de expressão digeridos foi feita utilizando a proporção 2:1 (inserto:vetor), 5 unidades/µL da enzima T4 DNA ligase (*Thermo Scientific – USA*), e 1 mM ATP (Sigma-USA) em tampão específico da enzima a 16°C. A confirmação das construções foi realizada por sequenciamento automático no Laboratório de Sequenciamento de DNA do LNBio ou do Centro de Estudos de Genoma Humano na Universidade de São Paulo.

3.7 Produção das proteínas recombinantes para ensaios funcionais e estruturais

3.7.1 Produção da proteína ligadora de sulfato Sbp

Cepas de *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas com o vetor pET28a contendo o gene *sbp* previamente obtido no projeto de mestrado e submetidas à expressão segundo Pereira (2013). Resumidamente, a expressão da proteína foi realizada em meio LB, 200 rpm de agitação, indução com 0.1 mM de IPTG por 2 horas a 37°C. A extração das proteínas da fração solúvel foi realizada com 10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1% triton X-100 e 50 mM de NaCl. As amostras foram sonicadas por 5 min com intervalos de 30 segundos e centrifugadas por 40 minutos a 4 °C em 21.700 g. A purificação das proteínas a partir dos extratos solúveis foi realizada por dois passos de cromatografia. Primeiramente, foi realizada a cromatografia de afinidade a metal imobilizado em coluna Histrap (GE, Califórnia, CA, USA) de 5 mL no aparelho AKTA Purifier (GE). A eluição das proteínas foi realizada em gradiente de imidazol de 0 mM a 1 M acompanhado de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e 500 mM de NaCl 500. Em seguida, foi realizada cromatografia de exclusão molecular em coluna Hi Load Superdex 16/600 200 (GE). O tampão padrão para corrida foi 10 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 50 mM NaCl. Todas as etapas de expressão e purificação foram analisadas por meio de SDS-PAGE 12% e a concentração das amostras estimadas em espectofotometro NanoDrop (Thermo).

3.8 Ensaios de cristalização e refinamento da proteína Sbp, coleta e processamento dos dados dos cristais

Foram testados seis kits iniciais comerciais disponíveis no laboratório de cristalização do LNBio. As placas de 96 poços foram montadas pelo robô *HoneyBee* (Formula Matrix, USA). Gotas contendo 1 µL da solução do poço foram equilibradas contra 1 µL da solução do poço por difusão de vapor usando-se método da gota sentada (*sitting drop*) e incubadas a 18°C. A visualização dos cristais foi feita por meio de lupa e a partir de fotos tiradas pelo robô Rock Imager (Formula Matrix) que também fotografa com zoom e com emissão de luz UV. A incidência de luz UV permite diferenciar cristais de proteína dos cristais de sais. Após a obtenção dos resultados nas condições iniciais, os refinamentos foram realizados variando a concentração de precipitante, de sal e pH das condições iniciais que apresentaram resultados promissores. Essas condições foram produzidas e pipetadas pelo *HoneyBee* (Robolab, LNBio, na proporção de 1:1 (proteína:solução do poço).

Após obtenção de cristais, os dados cristalográficos da proteína Sbp foram coletados na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) em comprimento de onda ajustado em 1,743 Å. O detector usado foi o PILATUS 2M e a coleta foi realizada com oscilação de $\Delta\phi = 0,5^\circ$. Os cristais foram mantidos num fluxo de nitrogênio a 110 K para minimizar os danos da radiação. Soluções crioprotetoras como PEG400 e glicerol em várias

concentrações foram testadas para evitar o congelamento dos cristais. A distância entre o cristal e o detector foi de 200 mm.

Devido à baixa resolução dos cristais na linha brasileira, cuja melhor resolução foi de 3.2 Å, a proteína foi cristalizada novamente no Departamento de Bioquímica da Universidade de Cambridge na concentração de 8,9 mg/mL, (padrão utilizado nos ensaios de cristalização). Utilizando-se do robô Oryx6 (Douglas Instruments - USA) para triagem de kits comerciais da Universidade, novos cristais foram obtidos em 0.2 M de sulfato de potássio e 20% (w/v) PEG3350 como solução crio protetora. Os mesmos foram gentilmente difratados pelo Prof. Marko Hyvonen na linha I02 do *Diamond Light Source, Oxfordshire*, Reino Unido utilizando o detector Pilatus 6M.

3.9 Análises dos dados, substituição molecular e refinamento da estrutura da Sbp de *X. citri*

As reflexões das imagens de menor resolução foram indexadas e integradas utilizando o programa XDS [60] e escalonadas com o programa AIMLESS [61]. A primeira molécula de Sbp foi identificada por substituição molecular com o programa MOLREP [62] utilizando um modelo criado no CHAINSAW a partir das coordenadas estruturais do ortólogo de *Salmonella thyphimurium* (PDB: 1SBP) [63] e a sequência da proteína Sbp de *X. citri*. O refinamento da estrutura foi feito utilizando os programas REFMAC5 [64] e Coot [61].

3.10 Titulação calorimétrica isotérmica (ITC) da proteína Sbp na presença do ligante

Para os experimentos de ITC foram realizados vários testes preliminares de otimização da concentração ideal da proteína Sbp, estabelecida a 50 µM, titulada com 300 µL de sulfato de magnésio (200 µM). Os ensaios foram realizados a 15°C usando o equipamento VP-ITC 2000 microcal no Laboratório de Calorimetria e Espectroscopia do LNBio e posteriormente na Universidade de Groningen com o equipamento VP-ITC 200 microcal. Ligante e proteína foram mantidos no mesmo tampão de 10 mM de Tris-HCl pH 8.0 e 50 mM de NaCl. Primeiramente, realizou-se experimento de titulação do tampão para averiguar possíveis trocas de calor. A titulação foi feita com 27 injeções de ligante, sendo a primeira de 1 µL (0.66 µM) e as demais de 3 µL (2 µM) para as titulações realizadas no ITC2000. Para os ensaios no ITC200, a concentração máxima utilizada para proteína foi de 170 µM seguindo o mesmo padrão de injeções do equipamento anterior.

3.11 Fluorescência intrínseca de triptofanos

Os ensaios de fluorimetria foram monitorados no fluorímetro Multifrequency Phase Fluorimeter do Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria do LNBio. As bandas de excitação e emissão foram de 4 e 8 nm, respectivamente. As cubetas utilizadas tinham caminho óptico de 1x1 cm e a temperatura controlada por termostato. A Fluorescência foi medida no comprimento de onda de 295 nm (para detecção ambos aminoácidos: triptofanos e tirosinas). O espectro de emissão no intervalo de 300 a 450 nm. Todas as medidas foram realizadas no tampão 10 mM de Tris-HCl pH 8.0 a 15°C. A concentração de proteína foi de 1 µM. A titulação do sulfato de sódio foi realizada com variação de 0,1 µM a 10 µM e os espectros registrados nas mesmas condições. Dados de fluorescência foram corrigidos pela diluição e efeitos de filtro interno [65]. Os dados foram corrigidos utilizando a equação hiperbólica usando regressão linear dos mínimos quadrados. Para obtenção do n e constante de ligação (*binding constant* K_b) foi utilizada a equação I $\log \left[\frac{(F_0 - F)}{F} \right] = \log K_b + n \log [\text{ligante}]$ [66]. Como controle negativo foi titulado sulfato de molibdato sob mesmas condições. Foram realizados três experimentos independentes.

3.12 Testes para produção dos domínios ATPase e transmembrânicos do transportador ABC a partir de diferentes construções

Várias cepas de *E. coli* foram testadas sob diferentes condições de aeração, temperatura e concentração de agente indutor (IPTG) conforme descrito a seguir.

- **Cepas Testadas:** *E. coli* Tuner®, *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 (DE3) C41, *E. coli* BL21 (DE3) C43, *E. coli* ROSSETTA2 (DE3), *E. coli* LEMO21 (DE3).
- **Temperaturas testadas:** 37°C, 30°C e 18°C
- **Concentração do agente indutor (IPTG):** 0.1 mM, 0.4 mM e 1 mM
- **Aeração:** 25% e 50% * (com aumento de escala)

3.13 Avaliação do crescimento das linhagens selvagem e mutantes de *X. citri* em diferentes meios de cultivo

Células de *X. citri* foram crescidas em meio LB (Luria Bertani) sem sal (10% Tripton; 5% Extrato de Levedura) com antibiótico ampicilina (100 µg/mL) por aproximadamente 24 horas. As culturas foram centrifugadas, lavadas em água tipo MilliQ estéril e inoculadas em meio LB sem sal e meio XAM1 (3,8 mM de sulfatos), que mimetiza o ambiente da folha. O meio XAM1 é preparado conforme [41, 67]. Este é composto de duas

etapaas. A primeira etapa é a produção da Solução 1 que contém por litro 5 g de sulfato de amônio, 22,5 g de fosfato de potássio monoácido e 52,5 g de fosfato de potássio diácido, 2,5 g de citrato de sódio. A solução 1 foi autoclavada a 121°C por 15 minutos e reservada. Na hora da montagem do meio foi adicionado: 1M de Sulfato de magnésio; 36% (m/v) de frutose, 68 % (m/v) de sacarose, 30% (m/v) de casaminoácidos e 10% (m/v) de albumina. A solução de albumina foi filtrada e as demais autoclaves e misturadas apenas na hora cultivo da bactéria. As culturas foram crescidas durante 48 horas a 30 °C com 200 rpm de agitação. As amostras foram normalizadas para 10⁴ UFC/mL sendo cada cultura transferida para tubo de micro centrifuga a 11.000 g por 2 minutos.

3.14 Extração de extratos de proteínas totais de *X. citri*

As células provenientes dos vários meios de cultura foram ressuspensas em 10 mM de tampão Tris-HCl pH 8,0 e 5 mM EDTA, aquecidas a 70°C por 30 minutos e submetidas à sonicação por 1 minuto com pulsos e intervalos de 15 segundos na amplitude de 20%. O extrato foi centrifugado a 21.000 g por 30 minutos. A concentração das proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976) [68].

3.15 Western blot para identificação de proteínas recombinantes

Para a verificação/confirmação da presença das proteínas recombinantes em diferentes amostras utilizamos o anticorpo Anti-His (GE). Após realização do SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF em em cuba de transferência (Biorad - USA), na corrente de 100 V e tempo de transferência de 27 minutos. Para bloqueio da membrana de PVDF (Hybond C – Amersham Pharmacia Biotech AB) foi usado 5% de albumina em tampão TBS pH 7,4 + 0,05% de Tween (TBST) 16 horas ou a 4°C ou a temperatura ambiente por 1 hora. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBST três vezes para a adição do anticorpo (anti-sbp) na titulação mínima de 1:3.000. O tempo de incubação foi de 1 hora. A membrana foi lavada três vezes com tampão TBST e o segundo anticorpo, conjugado anti-IgG-fosfatase (camundongo) (Sigma- USA), foi adicionado na diluição de 1:30.000 µl, incubado por 1 hora, seguido de três lavagens com TBST. Após este procedimento a membrana foi revelada com a adição da solução reveladora, que apresenta substratos da fosfatase alcalina (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.02% BCIP e 0.03% NBT) (Sigma – USA) por até uma hora. Para parar a reação foi

adicionada a solução de 5 mM EDTA em água tipo MilliQ.

3.16 Produção de bactérias mutantes não polares utilizando o vetor suicida pNPTS138

Para estratégia de mutação, o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores e a construção dos mutantes *Xac::cysU* e *Xac::cysUW* foram realizadas em colaboração com o Dr. Celso Benedetti do Laboratório Nacional de Biociências (LNBIO/CNPEN). Primeiramente, o gene *cysU* foi o alvo escolhido por romper o complexo formador do poro. Na segunda tentativa, foi realizada a deleção de ambos os genes que formam o domínio transmembrana do transportador (*cysU* e *cysW*). Para ambas construções, foi utilizado o vetor suicida pNPTS138 [69] que apresenta a capacidade de realizar transferência de genes por conjugação em bactérias. Esse plasmídeo contém, resistência à canamicina para seleção das colônias e gene *sacB* de levedura para seleção nos eventos de recombinação homóloga. Resumidamente, no primeiro evento de recombinação homóloga, após a incorporação do plasmídeo, o produto gênico de *sacB*, a enzima levansucrase converte a sacarose presente no meio em um produto tóxico para célula impedindo o crescimento da mesma [69].

Foram realizadas uma série de amplificações das regiões de interesse com aproximadamente 1200 bp do gene à montante (denominada F1R1) e à jusante (denominada F2R2) para cada construção. A metodologia utilizada para produção da bactéria nocaute está descrita e adaptada de Andrade e colaboradores [70]. A reação de amplificação está descrita na Tabela 3 e os oligos utilizados na construção do mutante estão na Tabela 02.

3.17 Preparação e transformação de células eletrocompetentes de *X. citri*

Células de *X. citri* foram crescidas em meio LB durante 18 horas a 30°C e 200 rpm até atingirem a absorbância (600nm) de 0.5. As mesmas foram coletadas por centrifugação por 10 minutos 4000 g a 4°C. Todas as células foram lavadas em ambiente estéril com água desmineralizada por três vezes e ressuspensas em glicerol estéril 10% seguidas de congelamento a -80°C. De posse do vetor suicida contendo as regiões flanqueadoras de interesse, células de *X. citri* foram adicionadas de 300-450 ng de vetor e eletroporadas no equipamento Gene Pulser (BIO-RAD) na voltagem de 2.5 KV. As células foram imediatamente recuperadas em meio LB sem sal por 4 horas a 30 °C, 200 rpm e plaqueadas em meio seletivo contendo ampicilina e canamicina.

3.18 Produção dos mutantes não polares por recombinação homóloga

De posse das cepas de *X. citri* portadoras do vetor suicida, iniciaram-se as tentativas de obtenção dos eventos de recombinação homóloga para deleção dos genes de interesse conforme Andrade e colaboradores [70]. A Figura 5 apresenta um esquema do processo realizado. no primeiro evento de recombinação as colônias resistentes à canamicina e sensíveis à sacarose foram selecionadas e crescidas por 20 horas em meio líquido sem antibióticos. Foi realizada a diluição seriada da cultura para até 10^{-4} u.f.c./mL e plaqueamento em meio sólido contendo de 3 a 5% de sacarose. Após 48 horas as placas foram novamente repicadas. Após o mesmo período, as colônias que apresentavam sensibilidade à canamicina e resistência à sacarose foram selecionadas para confirmação da deleção por meio da reação em cadeia da polimerase com iniciadores específicos para cada mutação (Tabela 2). As colônias portadoras da deleção foram sequenciadas no Laboratório de Sequenciamento do LNBio.

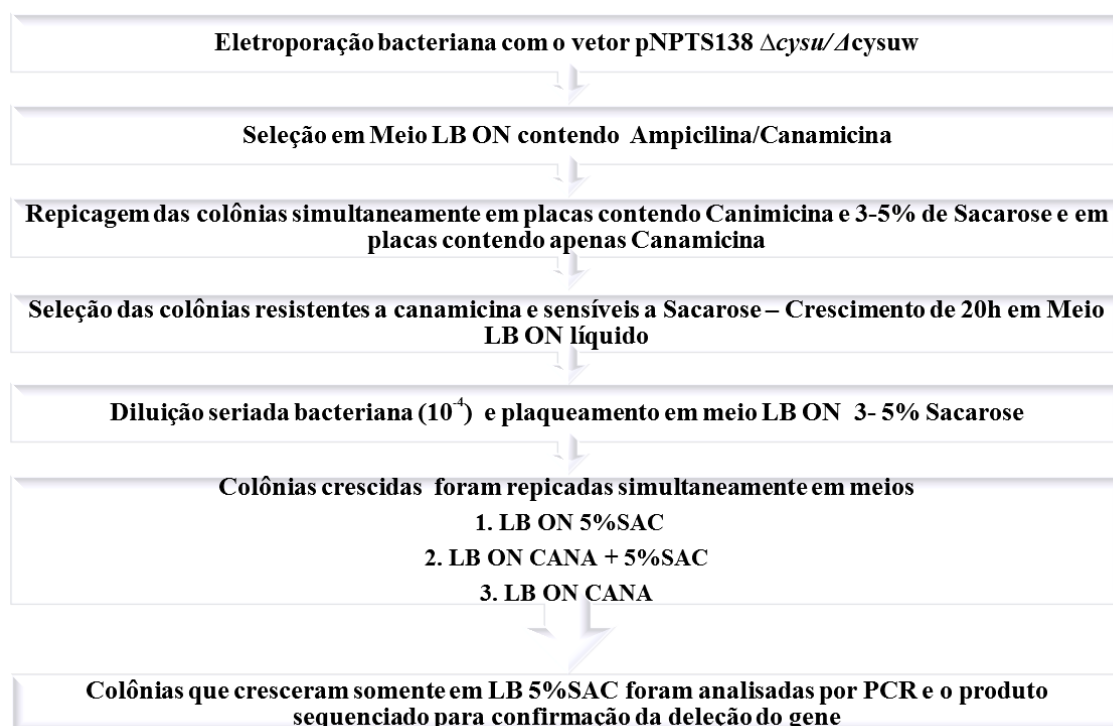


Figura 5 – Esquema geral do processo de obtenção dos mutantes de *X. citri* a partir de eventos de recombinação homóloga e seleção utilizados nesse trabalho.

3.19 Análise de sobrevivência e infectividade dos mutantes de *X. citri*

3.19.1 Curva de crescimento em meio rico e meio mínimo M9

As curvas de crescimento para as cepas selvagem e mutante foram realizadas em meio LB ON e em meio Mínimo M9 [71] conforme descrito no item 3.13.1. A absorbância a 600 nm foi monitorada durante 48 horas. Três amostras biológicas foram obtidas.

3.19.2 Avaliação do desenvolvimento do fenótipo do cancro cítrico em folhas de *Citrus sinensis* após infecção com *X. citri* e mutante *Xac::cysU* utilizando o método de injeção

As curvas de crescimento da *X. citri* selvagem e mutante *in vivo* em plantas de *C. sinensis* ou laranja doce foram realizadas de acordo com o protocolo utilizado por Cernadas e colaboradores (2008). As bactérias foram crescidas a 30°C em meio LB sólido com os devidos antibióticos, durante 24 horas. Após o crescimento, as células de *X. citri* e *Xac::cysU* foram recuperadas com espátula, lavadas e ajustadas para a concentração final de 10^4 u.f.c./mL e 10^6 u.f.c./mL, respectivamente. Com a finalidade de avaliar o efeito da mutação, três mutantes independentes de *Xac::cysU*, neste trabalho foram nomeados como M1, M5 e M8, foram utilizados para infecção nas cinco variedades de *Citrus sinensis*: Natal, Pêra, Sorocaba, Valência e Tahiti. As imagens para análise da cancrose foram obtidas após 10 dias de infecção em lupa com aumento de 10X.

3.19.3 Avaliação do desenvolvimento do fenótipo do cancro cítrico em folhas de *Citrus sinensis* após infecção com *X. citri* e mutante *Xac::cysU* utilizando o método de perfuração por agulha (*pinprick*).

As linhagens selvagem e mutante foram crescidas em meio LBON suplementado com 100 mg/L de ampicilina por 48 h a 28°C. Colônias isoladas das bactérias foram ressuspensas em água estéril, de forma que a densidade óptica a 600 nm fosse de 0.1. As suspensões bacterianas foram usadas para infecção usando o método *pinprick* de inoculação. As pústulas de cancro foram fotografadas após 11 dias de infecção no “*stereomicroscope*” Zeiss Discovery e as áreas de lesão medidas com o sistema ImageJ.

3.19.4 Ensaios de quantificação da produção de goma xantana

Este ensaio avaliou a quantidade de goma produzida pelas bactérias *X. citri* e *Xac::cysU* a partir da medida de peso seco de goma produzida pelas mesmas sobre o número de células. As linhagens selvagem e mutante foram crescidas em meio LB sem sal com os devidos antibióticos a 30°C por 16 horas com 200 rpm de agitação. Após o crescimento, as culturas foram diluídas em água estéril até atingir absorbância em 600 nm de 0.1 para o

mutante e 0.15 para a linhagem selvagem. Cada 3 mL foram usados para inocular 100 mL de meio LB com os devidos antibióticos. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4°C por 5 minutos. Os precipitados foram ressuspensos em 100 mL de cloreto de potássio 2% e 200 mL de etanol e, em seguida, centrifugados a 3800 g, 4°C por 20 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos tipo falcons e submetidos à liofilização por 18 horas. A goma liofilizada foi pesada para comparação de peso entre as linhagens selvagem e mutante segundo Vojnov e colaboradores, 1998 [72]. Três amostras independentes foram obtidas.

3.19.5 Extração de pigmentos totais para quantificação do pigmento xantomonadina

Para a extração da xantomonadina foi realizado o protocolo descrito por Starr e Stephens [73], no qual 50 mL de metanol 100% são adicionados a 1 g de bactérias para aquecimento a 90°C por 10 minutos. A presença de xantomonadina foi monitorada pela varredura da absorbância na região de 401 a 500 nm em intervalos de 3 nm. O espectro característico de absorção para o pigmento de xantomonadina é um pico a aproximadamente 445 nm e ondulações em 425 e 470 nm.

3.20 Extração de RNA e construção de cDNA a partir de linhagens de *X. citri* selvagem

Células provenientes de culturas bacterianas crescidas conforme descrito em 3.13.1 foram submetidas à extração do RNA com o conjunto de reagentes "*SV Total RNA Isolation System*" (Promega, Madison, MA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Após a obtenção do RNA purificado, fragmentos de cDNA foram amplificados com transcriptase reversa e oligos (dT)15 presentes no kit *GoScript™ Reverse Transcription System* (Promega), também seguindo as instruções do fabricante.

3.21 Monitoramento da expressão dos genes putativamente envolvidos na captação de sulfatos em *X. citri*

Para avaliarmos se houve expressão dos genes putativamente envolvidos na captação de sulfatos em *X. citri* foi realizado RT-PCR a partir do cDNA obtido na etapa anterior. Os iniciadores para essa etapa foram desenhados pelo programa primer Design (ThermoScientific- USA), o qual otimiza produtos de amplificação com 50 a 100 pares de base e com apenas um sítio de anelamento no genoma bacteriano. Alíquotas de 1 µL do cDNA e de RNA extraídos foram utilizadas respectivamente como molde e controle negativo

da reação. Os genes endógenos *proB*, *gyrB* e *16s* foram utilizados como controles positivos. A reação foi utilizada conforme tabela 4.

Tabela 4. Iniciadores desenhados pelo programa Primer Design 2.0 para identificação/monitoramento da expressão dos genes de *X. citri* envolvidos com a captação de sulfatos. (*) nome atribuído ao transportador de íons de *Rhodobacter capsulatus*.

Oligonucleotídio	Sequência	Gene
F_proB_103F	5' GGATTCCTATCGCGAATTCCT 3'	Endógeno
R_proB-206R	5' TGTAGCTGGAAATCGGGAACA 3'	<i>proB</i>
F_xac1018_758F	5' GGCGCGACTGCCATTG 3'	<i>cysU</i>
R_xac1018-818R	5' TGACCACCAACAAGATCACGAA 3'	
F_XAC1019-552F	5' CGACCACGTTCGTAACCTTTC 3'	<i>cysW</i>
R_XAC1019-616R	5' GCCCTGCTGCTCCATCAA 3'	
F_xac3304_654F	5' TCGAAGAAGAACGCCTGATCA 3'	<i>sacI</i>
R_xac3304_725R	5' CATAGGTCTTGCGAAATAGCTTT 3'	(<i>perO</i>)*
F_xac0004_108F	5' TATATCGGCGACGTCCATGA 3'	Endógeno
R_xac0004_193R	5' CCGGCAAGGGCTTCGT 3'	<i>gyrB</i>
F_xac0766_545F	5' AGCGCCCGGCAGTGA 3'	Endógeno
R_xac0766_601R	5' CGTCGAGCACGGTTTCG 3'	16S
F_xac0613_339F	5' GATGCGCTTTGTCAGCAGTTC 3'	<i>ypaR</i>
R_xac0613_411R	5' TTGCGCTGCGAAGATGAG 3'	(<i>sulP</i>)**
F_xac1581_590F	5' TTCTGCCGGGTGCATTG 3'	<i>ychM</i>
R_xac1581_657R	5' GACATTCAAGCCCTGCAACTG 3'	(<i>sulP</i>)**
F_xac3339_98F	5' TGTCCAAGCAGCTCAAGCA 3'	<i>cysB</i>
F_xac3339_158R	5' CCCTTGCGCACGAACA 3'	
F_xac3329_536F	5' AAAGCGTGCGTGTGTTTCC 3'	<i>cysD</i>
R_xac3329_310R	5' GAATCTTCTCGCGGTAGATGTACA 3'	

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho serão apresentados em duas partes, segundo os estudos funcionais (Parte I) e os estudos estruturais do transportador de sulfato SbpCysUWA (Parte II). Também são apresentados como ANEXOS 1 e 2 que correspondem os resultados deste trabalho na íntegra já publicados e discutidos em periódicos durante o período de execução desse projeto. O ANEXO 3, são resultados de projetos paralelos desenvolvidos ao longo da tese.

Os genes codificadores do transportador SbpCysUWA apresentam-se na forma de um único operon constituído dos genes *sbp* (que codifica a proteína ligadora de sulfato), genes *cysU* e *cysW* (codificam as permeases ou proteínas transmembrana) e o gene *cysA* que codifica a ATPase ou domínio ligador de nucleotídeos do complexo.

PARTE I – ESTUDOS FUNCIONAIS

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO TRANSPORTADOR SbpCysUWA EM *Xanthomonas citri*

4.1 Efeito da deleção do gene *cysU* em *X. citri*

Com o intuito de bloquear a função do transportador de sulfato de *X. citri*, decidiu-se deletar um dos genes responsáveis pela formação do poro de passagem, de forma que o mesmo fosse destruído. Outras abordagens seriam a deleção do gene correspondente à proteína periplasmática Sbp, ou ATPase CysA, mas já há relatos na literatura que descrevem a promiscuidade entre as proteínas periplasmáticas [74-76] e ATPases [77] entre diferentes sistemas. Os resultados obtidos para a construção do mutante *Xac::cysU* estão apresentados na Figura 6.

Na construção do primeiro mutante as etapas de clonagem foram bem sucedidas, inclusive o evento de recombinação no qual foram obtidas 8 colônias com a deleção do gene *cysU*. Três mutantes portadores da mesma deleção foram usados independentemente para confirmação do fenótipo.

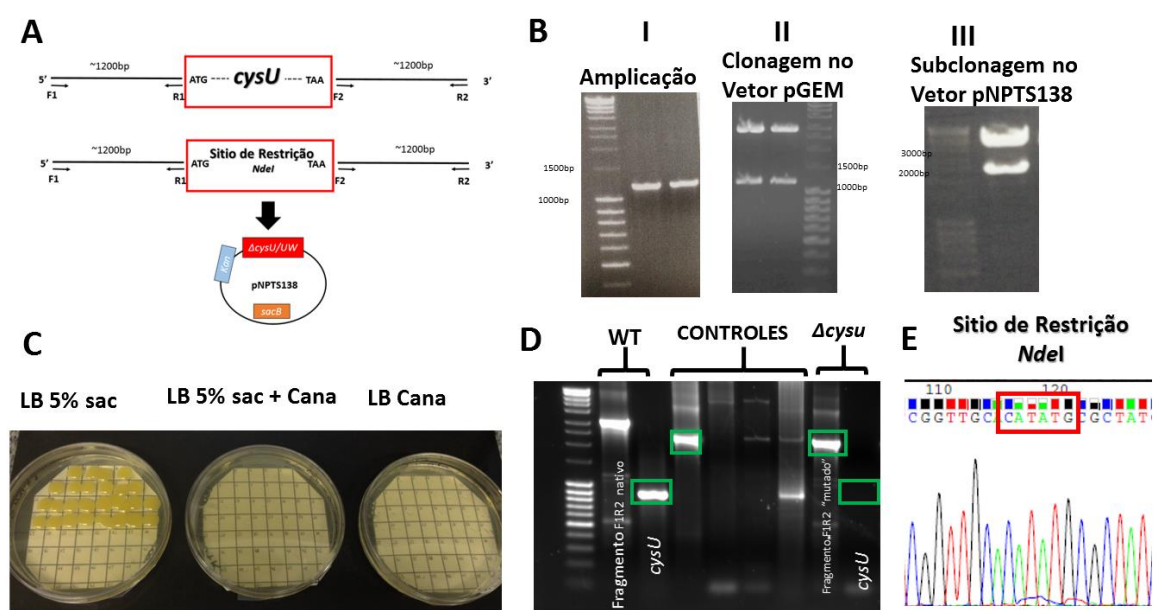


Figura 6– Construção do mutante *Xac::cysU* de *X. citri*. **A)** Representação esquemática das regiões do genoma bacteriano amplificadas (denominadas F1R1 e F2R2) e a substituição do gene alvo *cysU* pela inserção de um sítio de restrição entre os fragmentos com a finalidade de união dos mesmos e posterior inserção da região não contendo o gene de interesse no vetor suicida pNPTS138; **B)** Etapas de construção do vetor pNPTS::*cysU* (I) Amplificação dos fragmentos F1R1 e F2R2 por PCR; (II) Análise de restrição da clonagem dos insertos no vetor de clonagem pGEM T-Easy; (III) Análise de restrição da clonagem de ambos fragmentos no vetor pNPTS138; **C)** Placas de meio LB sólido com as colônias obtidas após a transformação com o vetor pNPTS::*cysU*. Para que tenha ocorrido o segundo evento de recombinação homóloga os candidatos a mutante devem apresentar crescimento em placas contendo 5% de sacarose (placa à esquerda) e não crescerem em meio com canamicina e 5% de sacarose (placa central) e meio com canamicina (placa à direita); **D)** Confirmação da construção do mutante por PCR mostrando o padrão de amplificação da bactéria selvagem (wt) nas duas primeiras linhas iniciais, sendo a primeira a amplificação dos fragmentos F1R1, *cysU* e F2R2 e, em seguida, a amplificação do gene *cysU*. Os controles positivos mostram as mesmas amplificações no vetor suicida pNPTS138::*cysU* e no vetor pGEM-*cysU*, ambos utilizados como controle. Por fim, as duas últimas linhas mostram o padrão F1R1-F2R2 condizente com padrão de deleção gênica e a ausência de amplificação do gene de interesse. **E)** Sequenciamento do fragmento F1R2 do mutante *Xac::cysU* confirmando novamente a eficiência da deleção

Assim, confirmada a deleção do gene foi dada continuidade aos ensaios de caracterização do fenótipo do mutante. Primeiramente, notou-se que as colônias portadoras da mutação no gene *cysU* eram menores e apresentavam características sugestivas de redução da produção de goma xantana, como a coloração mais atenuada e menos brilhante (Figura 7A). Interessantemente, esta alteração do fenótipo das colônias sugerindo a redução de goma xantana também foi observada nos mutantes de *X. citri* portadores de deleção nos genes *ssuA2* [6] e *nrtT* [58], comprovadamente deficientes na produção de goma xantana. Para analisarmos se a deleção de *cysU* afetou a produção de goma xantana, a linhagem selvagem e 3 mutantes

foram crescidos em LB, dos quais foram retiradas alíquotas em 24 h e 48 h. De fato, todos os mutantes mostraram redução na produção de goma xantana quando comparados com a linhagem selvagem. Ainda, dentre os três mutantes, o mutante M8 mostrou deficiência maior (Figura 7B). Por outro lado, apesar destas diferenças, a formação de biofilme nas linhagens mutantes não foi significativamente alterada (Figura 7C). A redução da goma xantana foi acompanhada pela redução na produção do pigmento xantomonadina, o que seria uma das possíveis causas da diminuição da intensidade da coloração das colônias (Figura 7D e E).

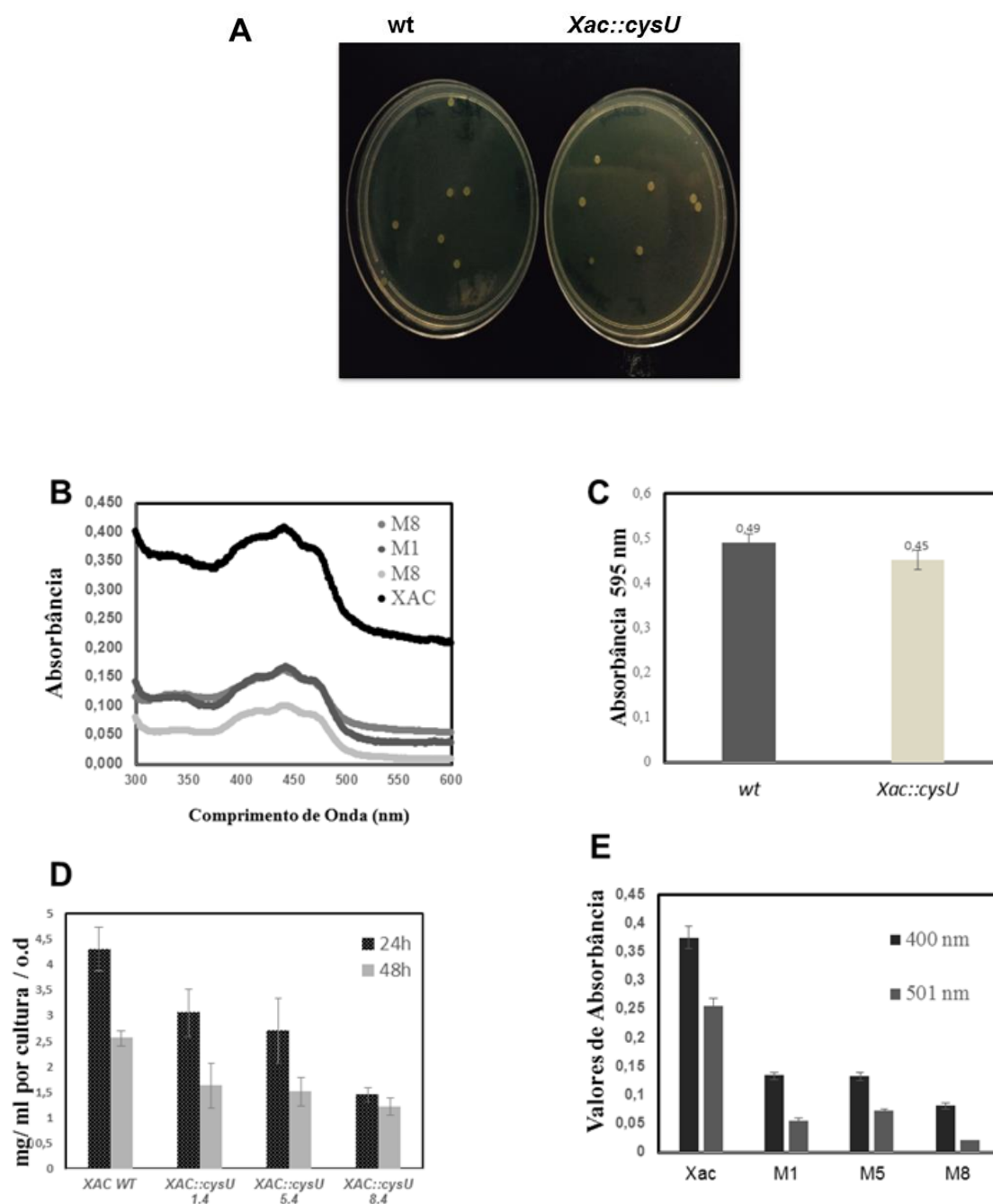


Figura 7 Análise do efeito da deleção do gene *cysU* no fenótipo e produção de goma e pigmentos em *X. citri*. **A)** Colônias de *X. citri* selvagem (wt) e mutante (*Xac::cysU*) após 24 h de incubação em meio LB OD. **B)** Produção de goma xantana pelas linhagens selvagem e três mutantes portadores de deleção no gene *cysU*: M1, M5 e M8. **C)** Efeito da mutação na formação de biofilme após 16 horas de cultivo das bactérias em meio LB ON. **D e E)** Quantificação do pigmento xantomonadina em *X.citri* e mutantes após 48 h de inoculação. Os asteriscos representam diferença significativa $p < 0.05$.

Para avaliar se a mutação no gene *cysU* e a redução de goma tiveram efeito no crescimento bacteriano em meio de cultivo, foram realizadas curvas de crescimento das linhagens selvagem e mutante em meios de cultivo LB e M9. Os resultados mostram que a deleção de *cysU* não afetou o crescimento bacteriano tanto em meio rico como em meio mínimo (Figura 8 A e B). No caso do meio rico, o comportamento do mutante era esperado visto que neste meio não definido várias são as fontes de sulfato/enxofre que a bactéria poderia utilizar [57, 76, 78-82]. Entretanto, ao limitar a fonte de enxofre exclusivamente como sulfato (concentração de enxofre definida em 2 mM de sulfato de magnésio), esperava-se que o mutante *Xac::cysU* não fosse capaz de crescer, o que não ocorreu (Figura 8B). Este fato sugere duas possibilidades: (i) a presença de outros transportadores que não do tipo ABC, relacionados ao transporte de sulfato e, (ii) recuperação do complexo transportador por meio da dimerização da proteína CysW.

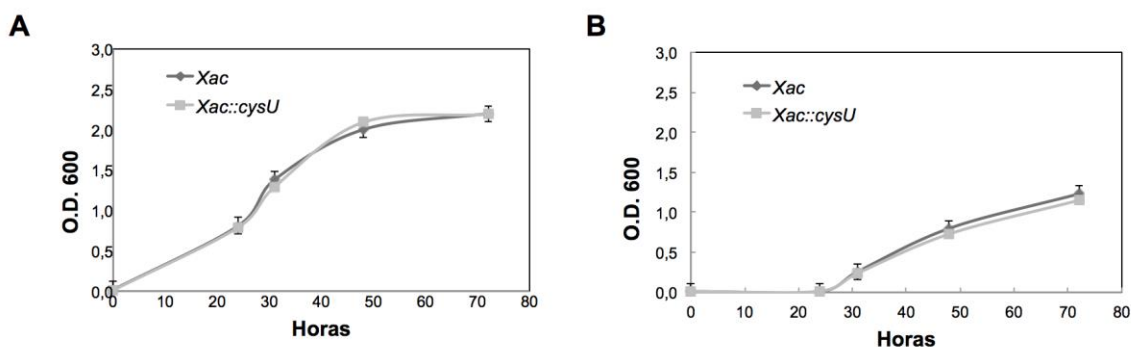


Figura 8 - Avaliação da mutação no gene *cysU* no crescimento de *X. citri* e mutante M8. As linhagens foram crescidas em meio LB ON (A) e M9 (B).

4.2 Análise do efeito da deleção no gene *cysU* na infecção e fenótipo do cancro *in vivo*

Para as análises *in vivo* duas abordagens de inoculação foram utilizadas, a primeira com uma dose maior de bactérias por meio de seringa, e a segunda com uma dose menor por das culturas após a formação de um pequeno corte nas folhas. Para os inóculos com seringas foi necessário fazer a análise da melhor concentração de bactérias, de forma a evitar uma superposição de bactérias na planta e as mesmas se usassem como fonte de nutrientes

mascarando assim o efeito planta-patógeno, de fato (Figura 9). Foram testadas duas concentrações de células: 10^4 u.f.c./mL e 10^6 u.f.c./mL. Todos os ensaios foram realizados em colaboração com o Dr. Celso Benedetti no LNBio/CNPq. Todos os ensaios foram realizados em colaboração com o Dr. Celso Benedetti no LNBio/CNPq.

Cinco variedades de *Citrus sinensis* foram usadas para a infecção com as linhagens selvagem e mutantes *Xac::cysU*. Após 10 dias de inoculação o fenótipo da cancrose foi avaliado nas superfícies das folhas (Figura 10). Os resultados mostraram que o fenótipo do cancro é variedade dependente, mas não evidenciaram, nenhuma relação com a deleção do gene *cysU*.

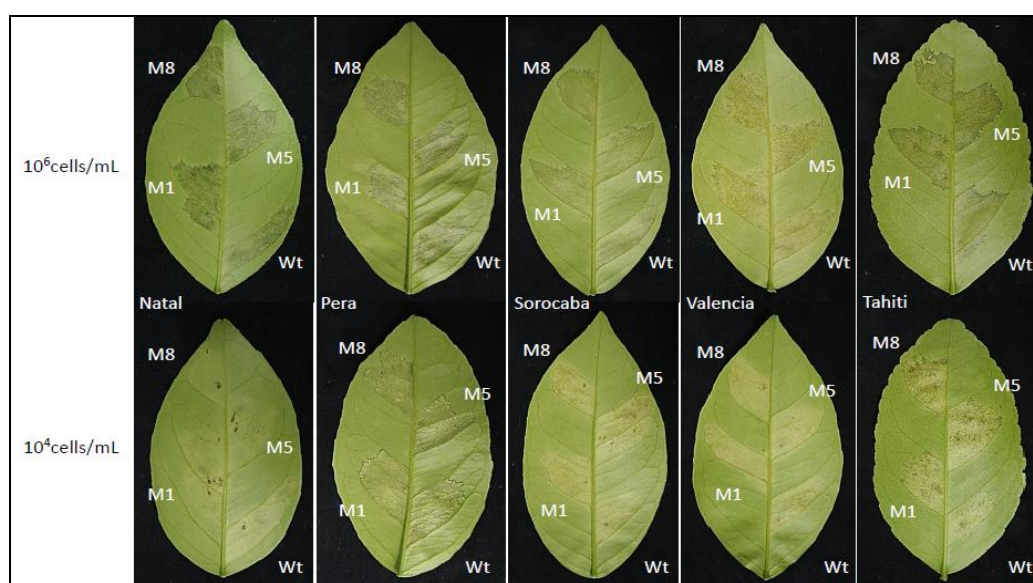


Figura 9 – Desenho experimental para determinação da melhor concentração de células para análises do efeito da deleção do gene *cysU*. Folhas de 5 variedades de *Citrus sinensis* foram infectadas com duas concentrações bacterianas e avaliadas após 10 dias de infecção. Wt: linhagem selvagem e mutantes *Xac::cysU* M1, M5 e M8.

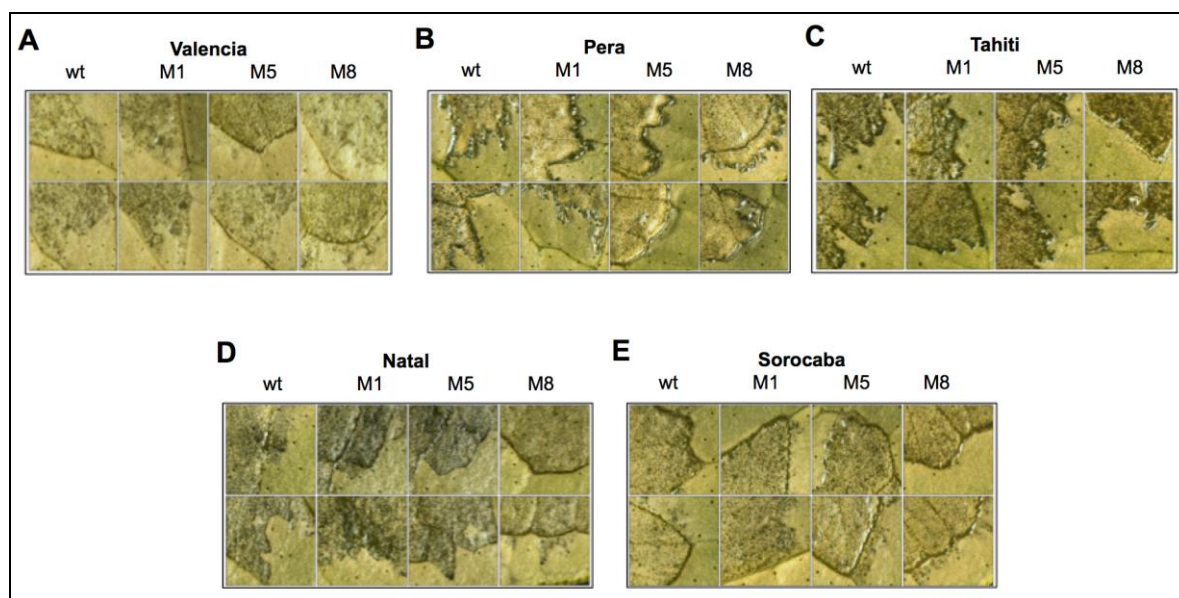


Figura 10 - Fenótipo de cancrose desenvolvido em superfície de folhas de *Citrus sinensis* após infecção por injeção das linhagens selvagem e mutantes. As linhagens foram infectadas nas folhas na concentração de 10^4 u.f.c./mL. Wt: linhagem selvagem, M1, M5 e M8: mutantes *Xac::cysU*.

Uma vez que a utilização da metodologia de inoculação por seringa não mostrou diferença entre as linhagens selvagem e mutantes, foi testada a abordagem com menor quantidade de células ou inoculação por picada (Figura 11). Nestes ensaios foram avaliados os diâmetros formados pelas células que infectaram e cresceram ao redor dos cortes e, diferentemente do que fora observado anteriormente, pôde-se evidenciar diferenças significativas entre o crescimento das linhagens selvagem e mutante nas variedades de *C. sinensis* Natal e Valencia confirmando a diferença do perfil da cancrose e espalhamento da lesão em diferentes variedades de citros.

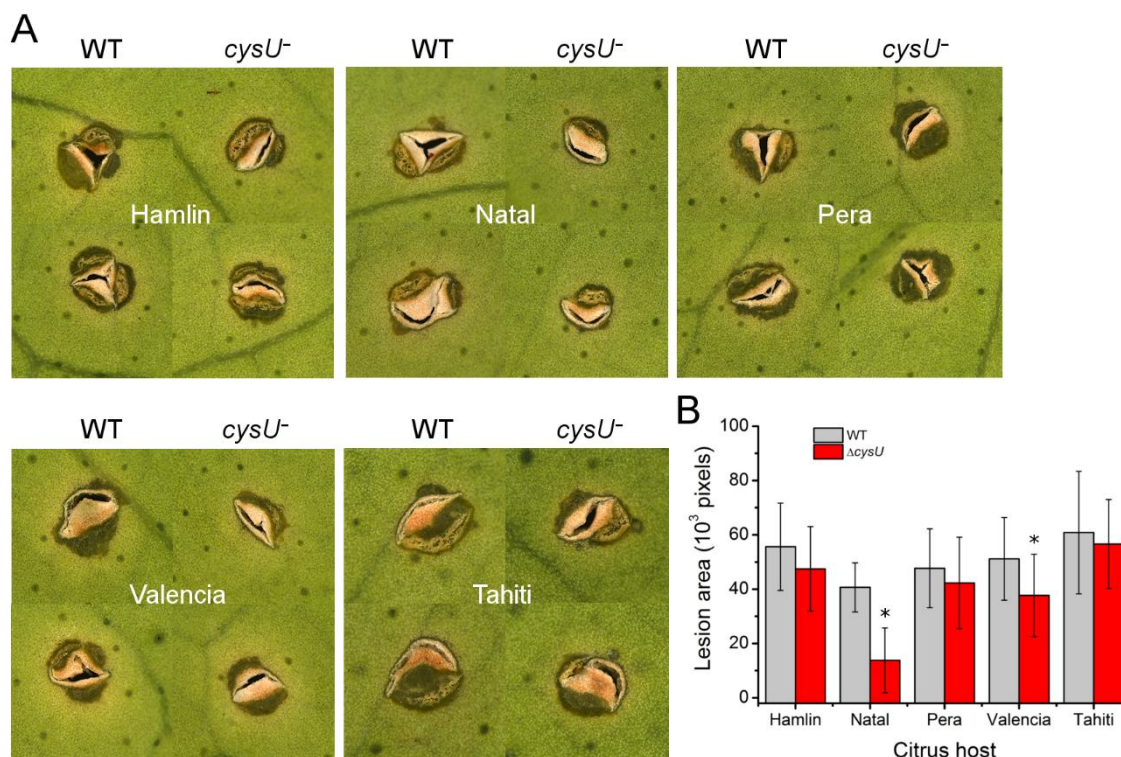


Figura 11– Efeito da deleção do gene *cysU* no início do desenvolvimento do cancro em diferentes variedades de *C. sinensis* segundo método da picada/“pinprick”. A) Imagens representativas evidenciando pústulas produzidas pelo desenvolvimento do cancro em folhas de laranja pêra, valencia, tahiti e sorocaba. As folhas foram inoculadas com a linhagem selvagem (Wt) ou mutantes portadores de deleção no gene *cysU*. As figuras foram obtidas com ampliação de 40 X após 11 dias de infecção. O mutante *Xac::cysU* tem redução na hipertrofia e hiperplasia em comparação à bactéria selvagem. **B)** Área de cancrose relativa medida pelo programa ImageJ (em *pixel*) mostrando que o mutante *Xac::cysU*, em média, forma menor área de lesão em comparação com a bactéria selvagem. Foram realizadas 16 medidas em 2 folhas independentes. Os asteriscos representam diferença significativa $p < 0.05$.

Este resultado mais evidente com a metodologia da picada mostra que a deleção, principalmente, teria um efeito em estágios mais avançados da infecção/colonização. De fato, Pereira e colaboradores (2015) [57], mostraram que o promotor que regula o operon *sbpcysUWA* é altamente ativado a partir de 7-8 dias de cultivo sugerindo que esta é a fase de maior necessidade do transportador. Aqui se pode destacar indícios de que essa deleção altera o modo como bactéria coloniza e se adere ao hospedeiro mas outras metodologias de pulverização do patógeno no hospedeiro serão aplicadas para confirmação da alteração no padrão de colonização e espalhamento *in vivo*. Por outro lado, o fato de que os mutantes não mostraram diferença na estatística no fenótipo do cancro, mesmo apresentando diminuição nos níveis de goma xantana sugere fortemente que realmente poderia haver complementação

por parte de outros transportadores e que estes são relevantes, como em muitos outros organismos [76].

Como mencionado anteriormente, algumas questões pertinentes foram levantadas: *(i)* poderia a permease CysW formar um homodímero e reconstituir assim o transportador do tipo ABC e a internalização do sulfato para o meio citoplasmático? *(ii)* poderia algum dos outros transportadores do tipo ABC transportar ou compensar de alguma forma a assimilação de enxofre tão importante para o crescimento bacteriano? *(iii)* seria possível alguma outra proteína transportadora realizar o transporte de sulfato?

A fim de responder se a permease CysW, na ausência de CysU, poderia formar um homodímero, reconstituir o transportador e assim manter a entrada de sulfato para o citoplasma, foi realizada a construção do mutante duplo *Xac::cysUW*. O vetor suicida foi construído conforme Figura 12.

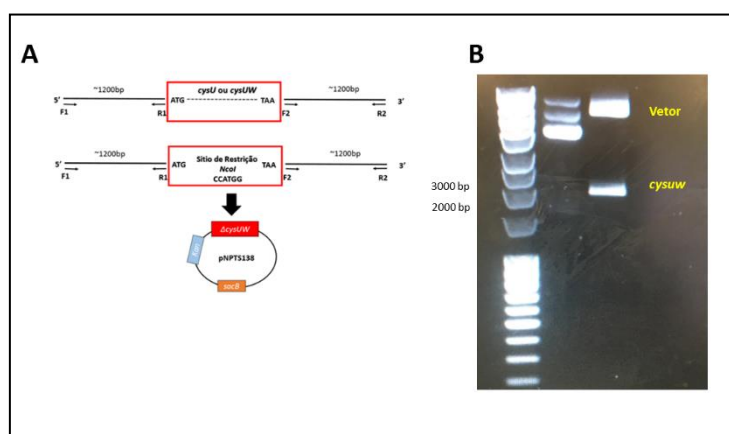


Figura 12 – Construção do duplo mutante *Xac::cysUW* A) estratégia da construção da dupla deleção B) Análise de restrição do vetor suicida pNPTS contendo o cassete de mutação para produção do evento de recombinação.

Inúmeras tentativas de recombinação de homóloga foram realizadas para essa construção, porém ao final da segunda recombinação só apareceram mutantes contendo o genótipo selvagem, confirmado por reação de PCR (dados não mostrados). Várias alterações no protocolo foram realizadas sem obtenção do genótipo da dupla mutação. É possível que a dupla mutação gere instabilidade como mencionado por outros autores [83]. Neste caso, não foi possível mostrar se há formação do homodímero por parte da permease CysW. Por outro lado, este tipo de comportamento nunca foi descrito em transportadores ABC. Por outro lado, acredita-se que a segunda hipótese de que o fenótipo complementado seria um efeito da atividade de outros transportadores do tipo ABC envolvidos com o transporte de compostos sulfonados, seja bastante factível [46, 78, 84]. A importância destes transportadores durante o

crescimento *in vivo* e as análises estruturais que mostraram diferenças significativas nos bolsões de ligação dos substratos, evidenciaram que apesar de terem substratos similares, eles não são capazes de complementar uns aos outros. Neste caso, os três transportadores poderiam estar em atividade. A expressão dos genes dos transportadores SsuABCDE1 e SsuABCD(2) foi demonstrada em Pereira e colaboradores (2015) (ANEXO 1).

4.3 Outros sistemas de captação de íons (sulfato) em *X. citri*

Nos últimos anos, a anotação de vários genomas, inclusive o genoma de *X. citri* tem sido sistematicamente revistos [19, 35]

De posse da informação os quais mostram que a bactéria mutante continua captando sulfato como fonte de enxofre, foi realizada nova busca no genoma bacteriano para verificar-se se outros sistemas de captação haviam sido anotados em *Xanthomonas*. Os carreadores de soluto (SLCs) pertencem a uma família de proteínas de membrana que regulam transporte de vários tipos de substratos através da membrana celular. Essa é a segunda classe de proteínas de membrana, perdendo apenas para as Proteínas G acopladas. No total já foram relatadas 55 famílias de genes, 46 em humanos [85].

As proteínas codificadas pelos genes SLC funcionam como transportadores passivos, simporter ou anti-exportadores responsáveis pelo transporte de uma grande variedade de substratos, como aminoácidos, glicose e íons inorgânicos através da membrana [86]. Os transportadores de soluto contêm múltiplos domínios transmembranares, organizados em monômeros, homo- ou hetero-oligômeros na membrana. Como proteínas de membrana, os transportadores de soluto são regulados por ubiquitinação em humanos. [86]. Essas proteínas mediam o fluxo de substâncias como íons, açúcares e aminoácidos. Os seus parentes procarióticos são muito pouco estudados mas estão frequentemente envolvidos em processos fisiológicos essenciais em microorganismos, como homeostase e resposta ao estresse ácido/osmótico Schweikhard [87].

De posse da informação que haveria a possibilidade de haver carreadores em bactérias [85, 88] foram repetidas as buscas com redução da porcentagem de identidade foram identificadas mais três proteínas preditas como permeases da família SLC possivelmente internalizadoras de sulfato. O carreador de sulfato SLC13 (NCBI) que em *X. citri* corresponde à proteína Sac1 (Xac3304) recentemente anotada como regulador em resposta à carência de sulfato e dois de carreadores de sulfato de alta afinidade tipo SulP (família SLC26, NCBI), as proteínas YbaR (Xac0613) e YchM (Xac1581). Essa última classe é bem conhecida tanto em

eucariotos quanto em procariotos, haja visto que existem mais de 30 membros sequenciados entre bactérias, fungos, plantas e animais. Ambas as classes têm como função a importação de íons divalentes como sulfato e oxalato e monovalentes como bicarbonato, formato e cloreto [89, 90]. Estão descritas na literatura como parte de mecanismos de adaptação para os mais diversos ambientes de fitopatógenos, facilitando a entrada de nutrientes[20]. Poucas dessas proteínas são funcionalmente caracterizadas, e todos são carreadores de absorção de sulfato. Alguns transportam seu substrato com altas afinidades, por exemplo, SLC26, enquanto outros o transportam com afinidades relativamente baixas por exemplo, SLC13. Curiosamente, ambas estão presentes na maioria das espécies do gênero *Xanthomonas*. As proteínas bacterianas em geral, são menores do que as de eucariotos e apresentam em média, de 10 a 13 hélices transmembranas (TMSs). A tabela 5 mostra os resultados do BlastP para identificação de possíveis ortólogos em fitopatógenos, bactérias de solo e *E. coli* como modelo. De fato, a redundância da captação do sistema de sulfato mostradas pelas famílias SLC13 e SLC26, especialmente em *X. citri*. Esses dados abrem perspectivas para análises desses domínios e a sobrevivência e infectividade no hospedeiro.

Tabela 5 – Comparação dos ortólogos das proteínas carreadoras de solutos identificadas em *X. citri* (SacI, YbaR e YchM) após a busca com a ferramenta BLASTP.

<i>Microorganismo</i>	<i>SacI</i> (<i>xac3304</i>)	<i>YbaR</i> (<i>xac0613</i>)	<i>YchM</i> (<i>xac1581</i>)
<i>Xanthomonas citri</i> (<i>xac</i>)	620/620(100%)	495/495(100%)	522/522(100%)
<i>Xanthomonas campestris</i> (<i>xcc</i>)	618/620(99%)	493/495(99%)	506/522(97%)
<i>Xanthomonas oryzae</i> (<i>xoo</i>)	609/620(98%)	484/495(97%)	507/522(97%)
<i>Xanthomonas fuscans</i> (<i>xfu</i>)	617/620(99%)	490/495(99%)	Sem identidade
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (<i>sml</i>)	543/615(88%)	277/485(57%)	127/478(27%)
<i>Xylella fastidiosa</i> (<i>xfa</i>)	526/617(85%)	Sem identidade	Sem identidade
<i>Caulobacter crescentus</i> (<i>ccr</i>)	Sem identidade	Sem identidade	Sem identidade
<i>Escherichia coli</i> (<i>eco</i>)	172/638(27%)	266/490(54%)	116/384(30%)

4.3.1 Proteína reguladora de resposta a sulfato: SacI de *X. citri*

Recentemente, Hoffman e colaboradores (2017), caracterizaram funcionalmente uma proteína carreadora presente na membrana de *Rhodobacter capsulatus* da família SLC13,

PerO, que tem como função o transporte de oxiânions. Este artigo foi de extrema relevância para o estudo porque os autores compararam a atividade da proteína frente à deleção do transportador do tipo ABC dedicado à captação de sulfato e mostraram pela primeira vez, que PerO pertence à família de permeases transportadoras de sulfato de baixa afinidade em bactérias[84] .

Adicionalmente, foi mostrada a ausência de transporte de sulfato marcado quando ambos os genes codificadores de ambos os sistemas, *perO* e os genes do transportador ABC (*cysTW*), foram deletados (Figura 13)[91]. PerO é um regulador ativado na carência de enxofre que pertence à classe de permeases ArsB/NhaD (Figura 13A). Estas proteínas translocam sódio e vários ânions através de membranas biológicas nos 3 reinos da vida. Uma permease típica da família ArsB/NhaD é composta de 8 a 13 hélices transmembranas e segundo a predição de estrutura secundária de PerO de *R. capsulatus*, a proteína apresenta 11 hélices transmembranas com um domínio extracelular entre as hélices 6 e 7 (Figura 13 B).

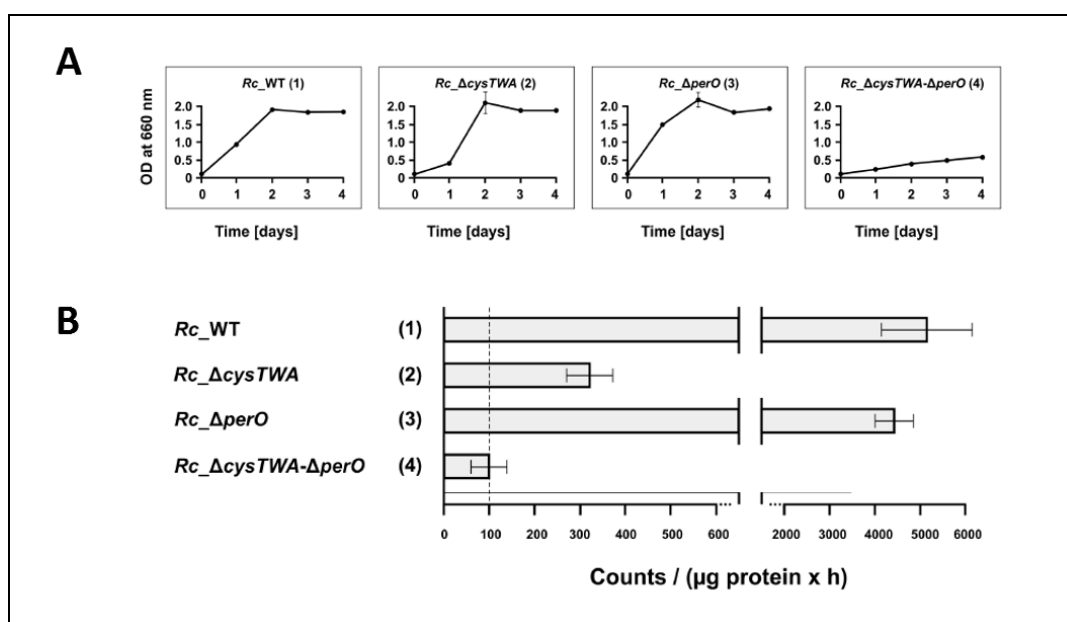
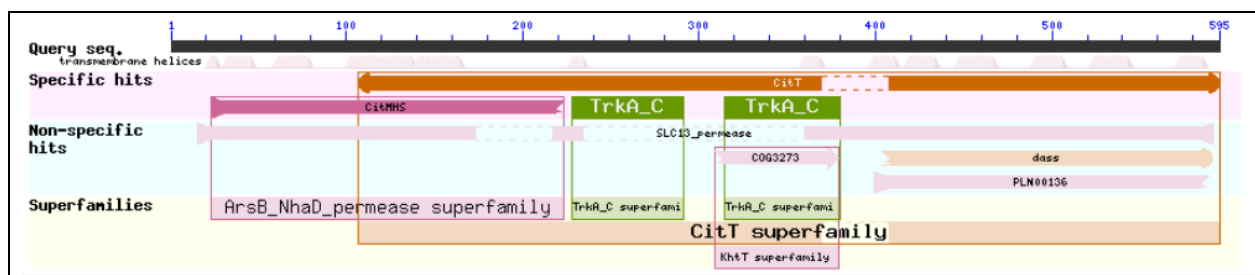


Figura 13 –Análises funcionais das mutações envolvendo componentes da captação de sulfato em *Rhodobacter capsulatus*. A) Curvas de crescimento de *R. capsulatus* linhagens selvagens, mutante do transportador ABC, mutante *perO* e duplo mutante *perO* e transportador ABC, evidenciando a ausência de crescimento quando os genes *perO* e *cysTW* são deletados. **B)** Captação de sulfato nas diferentes linhagens de *R. capsulatus*. RETIRADO e ADAPTADO de [84].

Como mencionado anteriormente, a partir da informação de que haveria um outro transportador de baixa afinidade dedicado à importação de sulfato, usamos a sequência de aminoácidos da PerO de *R. capsulatus* para realizamos uma busca pelo BLASTp em *X. citri*. O resultado desta análise identificou a proteína SacI (Xac3304) que apresenta 21% de

identidade de sequência em relação à PerO de *R. capsulatus* (Figuras 14 e 15). Esta proteína possui os mesmos domínios e predição de número de hélices transmembrana encontrados em PerO, incluindo o domínio extracelular. A análise da SacI no programa String mostra que a proteína pode interagir com todas as proteínas da via de assimilação de sulfato reforçando a sua possível função como um transportador adicional (Figura 15C).

A



B

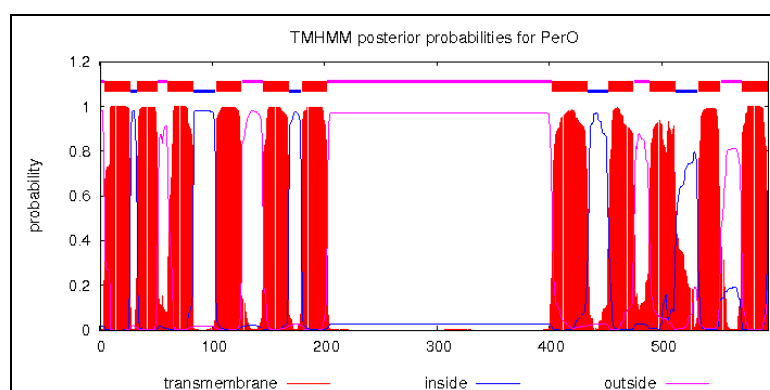
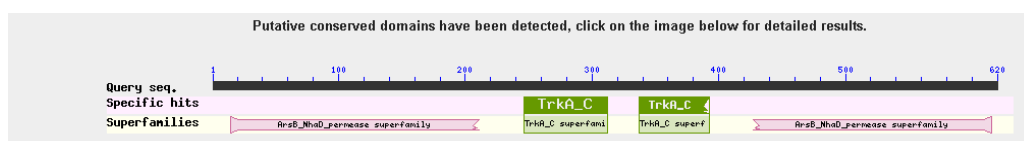


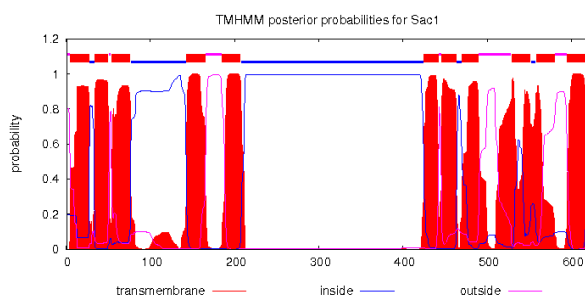
Figura 14– Análises de bioinformática da proteína PerO de *Rhodobacter capsulatus*. **A)** Resultado do Blastp X banco de dados não redundante evidenciando os domínios que definem a família de carreadores de soluto. **B)** Predição do número de hélices transmembranas da PerO utilizando o servidor TMHMM.

Preliminarmente, para avaliar mais algumas características estruturais da SacI, foi realizada a busca no banco de dados de proteínas por proteínas que apresentassem similaridade estrutural e que pudessem servir como molde para a construção de um modelo tridimensional. Ao realizar a busca Blastp X PDB, foram identificadas poucas proteínas que apresentaram alta similaridade com SacI. A proteína que mostrou os melhores resultados foi o transportador de sódio tipo symporter de *Vibrio cholerae* com apenas 14% de identidade (PDB 4F35). Apesar da baixa identidade, ambas as proteínas pertencem à super família SLC13, que possui importadores de sulfatos em todos os reinos [92]. Desta forma foi construído um modelo tri-dimensional da proteína SacI de *X. citri* (Figura 16).

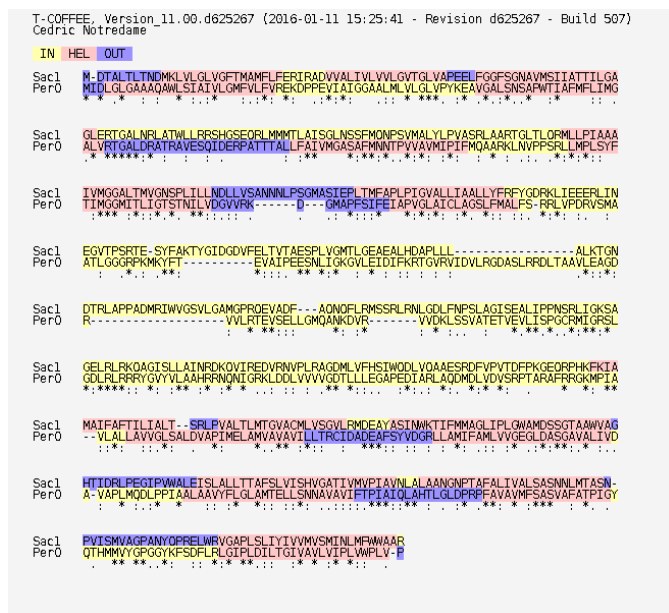
A



B



C



D

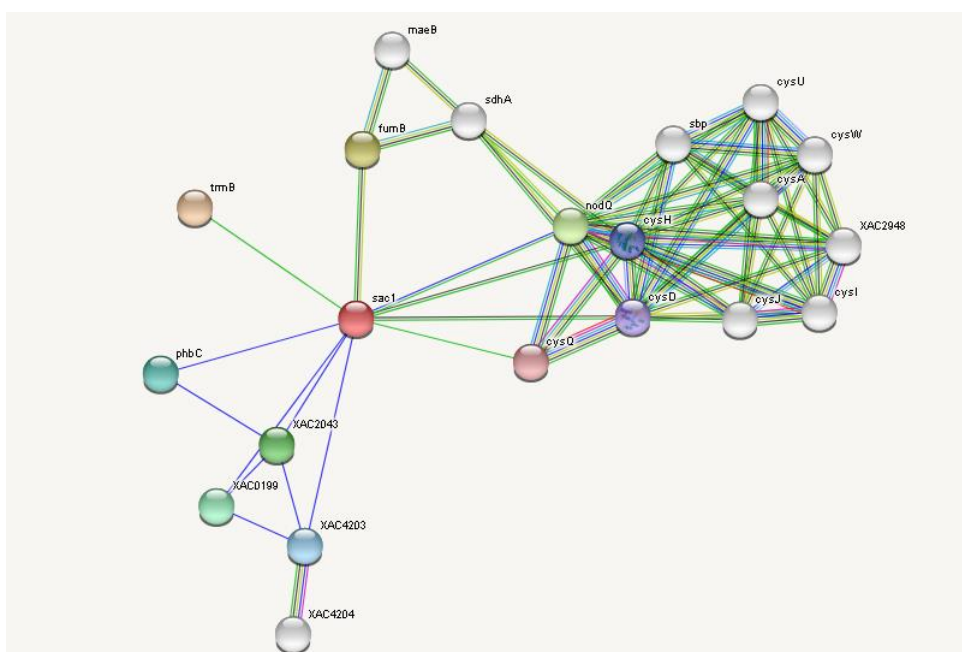


Figura 15—Análises de Bioinformática da proteína Sac1 de *X. citri*. A) Análises do Blastp evidenciando os domínios da proteína. B) Predição do número de hélices transmembrana pelo servidor TMHMM. C) Alinhamento de sequência das proteína Sac1 de *X. citri* com PerO de *R. capsulatus* evidenciando a conservação de predição de estrutura secundárias entre ambas. Predição realizada pelo programa T-Coffee [93] D) Possíveis interações de Sac1 com outras proteínas de *X. citri*. Os traços azuis mostram confiança e os traços verdes, evidências. O servidor utilizado para predição foi o STRING (<https://string-db.org/>).

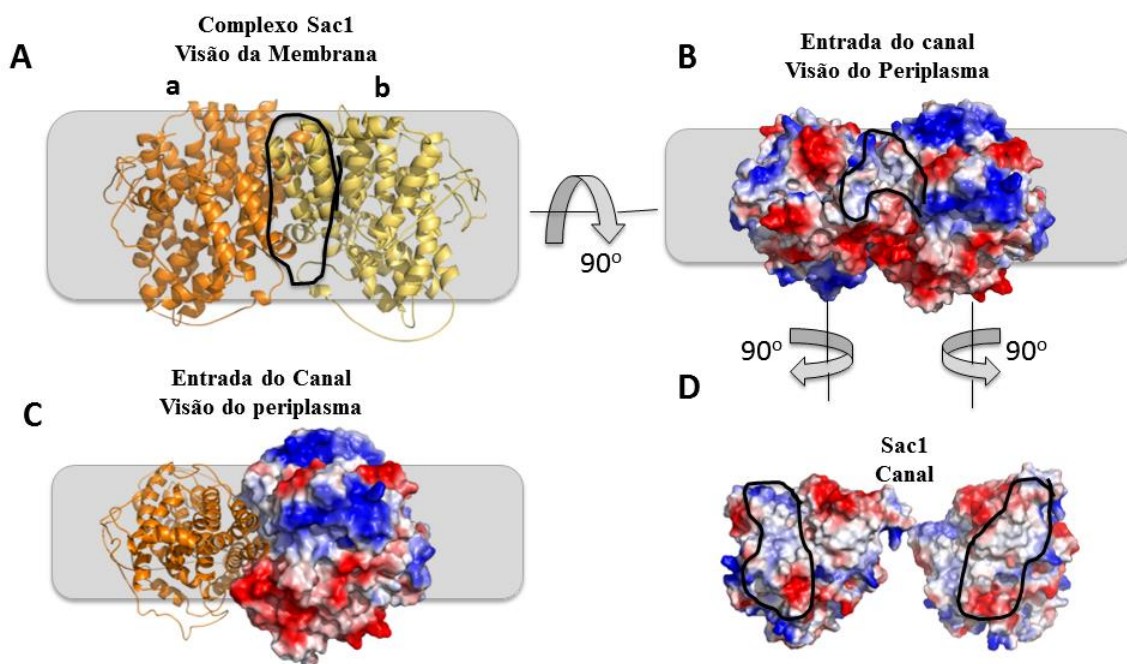


Figura 16 – Análise do modelo 3D construído para SacI de *X. citri* a partir da estrutura tridimensional do transportador de sódio de *V. cholerae* (PDB 4F35). A) Representação em cartoon do modelo da proteína. Seguindo a estrutura molde e os transportadores do tipo symporter, duas moléculas são presentes formando um homodímero. O canal de entrada do íon seria formado pela interface entre as duas moléculas (delimitado pela linha preta). B) Vista do transportador após giro de 90° evidenciando o potencial eletrostático da região que seria a entrada do transportador voltada para o periplasma. Segundo o modelo, SacI apresenta nesta região carga levemente positiva, o que está de acordo com o esperado, uma vez que este tipo de canal deve atrair oxianions com carga negativa. C e D) Potencial eletrostático predito a região que forma o interior do canal (em linhas pretas). As duas moléculas formadoras do transportador foram giradas em 90° de forma a expor a região interna do canal. Interessantemente, o canal mantém a carga levemente positiva para atrair o íon, mas torna-se mais negativo ao aproximar-se da região citoplasmática, de forma que poderia expulsar o íon.

Teoricamente, um bom modelo deveria ser baseado em estruturas que dividem alta identidade de sequências de aminoácidos. Contudo, em muitos casos, apesar da baixa identidade entre proteínas, as estruturas tri-dimensionais podem ser conservadas, mantendo as características funcionais das proteínas. Como a proteína de *V. cholerae* apresentou os mesmos motivos da família ArsB/NhaD (SLC 13) e sua função é a mesma predita para SacI, o modelo foi comparado com a estrutura molde para identificação de padrões de conservação.

Na análise, SacI seria um homodímero formado por duas moléculas em orientação simétrica, entre as quais se formaria o canal de passagem dos íons como definido pela linha preta na Figura 16A.

O potencial eletrostático do modelo também revelou que na região de entrada (ou de atração) do íon, no lado periplasmático, a carga é positiva, o que estaria de acordo com a expectativa para um canal que deve atrair ânions como o sulfato (Figura 16B). Ainda, mostra-se que internamente, o canal mantém esta carga levemente negativa, sugerindo que o íon poderia ser facilmente translocado. O mais interessante é que na região terminal do canal, próximo ao citoplasma, o mesmo se torna bastante negativo, o que poderia ser uma forma de forçar a expulsão do mesmo, como visto em muitos canais de sódio e potássio[90]. Este modelo, embora não seja conclusivo, se adequa a função predita do carreador. Futuras análises deste transportador devem ser realizadas para caracterização do mecanismo estrutural dessa proteína, bem como a sua função em *X. citri*.

4.3.2 Proteínas carreadoras do tipo SulP in *X. citri*: YbaR e YchM

Conforme descrito anteriormente, de YbaR e YchM possuem 20% de identidade de sequência entre si e, segundo o alinhamento realizado pelo servidor T-coffee [93], mostram considerável conservação estrutural (Figura 17 - resíduos em vermelho) e os mesmos motivos sugerindo que possam ser parálogos. De fato, muitos organismos, incluindo *Bacillus subtilis*, *Synechocystis sp*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* e *Caenorhabditis elegans*, possuem múltiplos parálogos da família SulP.



Figura 17 - Alinhamento das sequencias de YbaR e YchM de *X. citri* com o servidor T-coffee. O resultado mostra em vermelho maior conservação de similaridade estrutural entre as duas proteínas.

Na busca de ortólogos das proteínas YbaR e YchM, foi realizado um Blastp *versus* banco de dados não redundante. Nesta busca, várias espécies de *Xanthomonas*, incluindo *X. campestris* e *X. oryzae*, apresentaram as proteínas com alta identidade (99%), mas focamos em alguns microrganismos que apresentam dados na literatura (Tabela 6 e 7). Outro ponto interessante é que as duas sequências originaram os mesmos resultados. Na busca por proteínas no banco de dados de estruturas (PDB) não encontramos nada significativo que pudesse ser utilizado como molde.

Tabela 6 – Comparação da identidade de sequência dos genes anotados como SulP disponíveis no NCBI. Procura por BlastP não redundante usando gene *XAC1581* Proteína YchM como molde

<i>Microorganismo</i>	<i>Proteína Função Predita</i>	<i>Cobertura/Identidade(%)</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Permease SulP	302/491(62%)
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Permease SulP	237/482(49%)
<i>Rhizobium tropici</i>	Permease SulP	233/499(47%)

<i>Escherichia coli</i>	Permease SulP	178/501(36%)
<i>Caulobacter vibrioides</i>	Permease SulP	104/379(27%)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Permease SulP	180/501(36%)
<i>Xylella fastidiosa</i>	Permease SulP	Sem identidade

Tabela 7– Comparação da identidade de sequência dos genes anotados como SulP disponíveis no NCBI. Procura por BlastP não redundante usando gene *XAC0613* Proteína YbaR como molde

<i>Microorganismo</i>	<i>Proteína Função Predita</i>	<i>Cobertura/Identidade(%)</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Permease SulP	362/479(76%)
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Permease SulP	360/472(76%)
<i>Escherichia coli</i>	Permease SulP	341/490(69%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Permease SulP	301/491(61%)
<i>Caulobacter vibrioides</i>	Permease SulP	265/483(55%)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Permease SulP	271/486(56%)

O alinhamento das sequências encontradas no BlastP foi realizado e mostrou identidades entre 16-20% (Figura 18A), com maior divergência para a proteína YchM de *X. citri*. Uma árvore construída no próprio programa ClustalW, mostra que as 4 proteínas com exceção de YchM, tem a mesma origem filogenética (Figura 18B).

A

```

Xsp_WP_055837928.1_SulP      MPQPHALSLARLRAEWCPSLSRELLAGAVATFALIEPIEIAFSFVAGVDP
Xac_XAC0613_YbaR             -----MSLLRAELAQRWASPARELMAGAVATFALIEPIEIAFAFVAGVDPQ
Rle_WP_027684068.1_SulP      -----MLLSSIRRDWSANPMREMLAGAVATFALIEPIEIAFSFVAGVDPE
Pae_NP_251253.1_SulP         -----MLQTLKQNWFSNLRGDLGLVVALALIEPIEIAFSIIAGVDPK
Xac_XAC1581_YchM             -----MNTSGIGGYFRQGLFGRDLLASVVVFLVALPLCMGIAIASGMPPA
                               :::*. *. .: :*  :::: :*: *

Xsp_WP_055837928.1_SulP      VGLFASFVISIVIAFTGGRPAMVSAAGSVALVAAPLVQSHGLPYLLAAG
Xac_XAC0613_YbaR             VGLFASFVIGIVIAFCGGRPAMISAAAGSVALVAAPLVAAHGLPYLLAAG
Rle_WP_027684068.1_SulP      VGLFASFVIGIVIAFAGGRPAMISAAAGSVALVAAPLVHAHGLPYLFAAG
Pae_NP_251253.1_SulP         IGLYASFMAVVIAFAGGRPGMISAATGAMALLMVNLVKDHGLQYLLAAT
Xac_XAC1581_YchM             AGLITGIVGGLVVGFAGSPLQVSGPAAGLAVLVFELVREHGAVALGPVI
                               ** .: .:*. * . *  :*.....::  **  **  * ..

Xsp_WP_055837928.1_SulP      LLAGVVQVIFGMLRLGVLRFVSSSVRTGFVNALAVLIFAAQLPHLRGAT
Xac_XAC0613_YbaR             WLAGVVQILFGVLRGVLRFVSSSVRTGFVNALAVLIFAAQLPHLLGAN
Rle_WP_027684068.1_SulP      LLAGLIQIVFGLLRGVLRFVSKSVRTGFVNALAILIFAAQMPHIIGAG
Pae_NP_251253.1_SulP         LLCGLVQLILAGYLRGSLRFVSRVVTGFVNALAILIFMAQLPELTDVG
Xac_XAC1581_YchM             LVAGAIQLIAGLCRAGVWFRMTSPAVVAGMLSGIGILIVASQAHVLMDDA

```

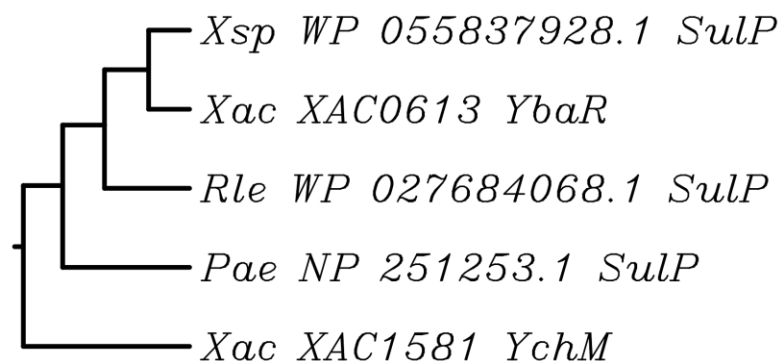

B

Figura 18 – Alinhamento de Sequência das proteínas preditas como SulP em *Xanthomonas citri* e a comparação com seus órtologos A) Alinhamento de sequências das proteínas identificadas no Blastp para YchM e YbaR e B) Dendograma enraizada (método UGPMA, programa ClustalW).

A partir destes resultados foram avaliados se os genes codificadores das permeases CysU e CysW do transportador ABC, dos carreadores SulP (ybaR e ychM) e da proteína SacI (XAC3304) eram expressos conjuntamente *in vitro* em meio rico LB e em meio XAM1, que mimetiza o ambiente em citros, conforme figura 19. Como controle positivo usamos três genes endógenos: proB (XAC2464), gyrB (XAC0004) e o 16S (XAC0766). As análises de RT-PCR mostraram primeiramente, que os genes endógenos usados como controle são transcritos nas duas condições. Ainda, revelaram a presença em meio LB dos genes correspondentes ao transportador ABC, cysU e cysW, bem como os dois genes sulP_Xac1581 e sulP_Xac0613 e conforme esperado o gene SacI, regulador da resposta de carência de sulfato, sugere não ser transcrito em meio rico, condizendo coma sua função predita. Este resultado sugere que em meio rico tais transportadores podem atuar simultaneamente, ou seja, o transporte de alta e baixa afinidade. Por outro lado, em meio XAM1, evidenciamos a presença de sacI mas não do gene sulP_Xac0613, sugerindo que SacI poderia estar associada à situações de estresse/carência e que sulP_Xac0613 poderia ser um transportador de baixa afinidade. Estes resultados preliminares abrem novas perspectivas deste trabalho para os estudos das proteínas envolvidas na regulação de captação de sulfato em *X. citri*, tanto do ponto de vista estrutural como funcional que continuam em fase de investigação.

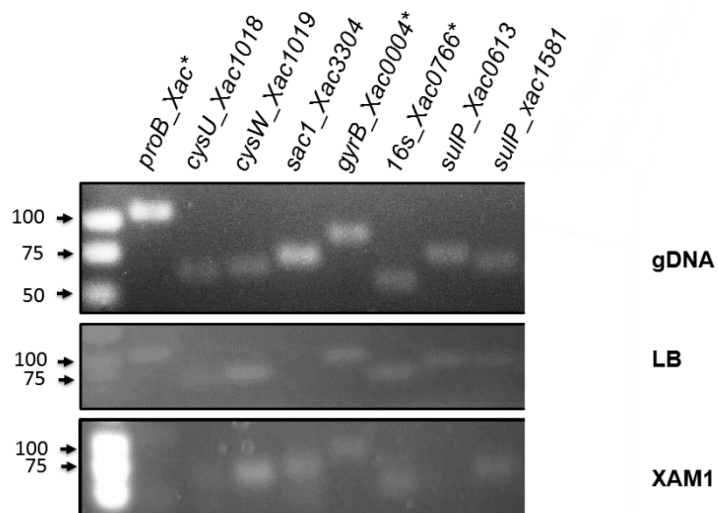


Figura 19 - Análise da transcrição por meio de RT-PCR dos genes putativamente relacionados ao transporte de sulfato em *X. citri*. Foram escolhidos os genes que codificam as permeases do transportador ABC CysU e CysW, bem como os genes que codificam para SacI (ortólogo de PerO de *R. capsulatus*), SulP(*) genes usados como controle endógenos.

PARTE II – CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO TRANSPORTADOR DE SULFATO DE *Xanthomonas citri*

4.4 Caracterização das proteínas do transportador de sulfato de *X.citri*

Para o início da caracterização do transportador completo, cada componente foi analisado por métodos de bioinformática visando a comparação de sequências com ortólogos e obtenção de dados estruturais que pudessem ajudar nos próximos passos de estratégia para clonagem, produção heteróloga e purificação. O modelo do transportador completo já havia sido brevemente apresentado no projeto de mestrado, mas foi analisado neste trabalho em todos os seus aspectos.

Como dito anteriormente, em *E. coli*, o transportador do tipo ABC SbpCysUWA realiza a internalização de sulfato através da membrana celular acoplando a hidrólise de ATP aos movimentos das permeases. Segundo a literatura atual, ao menos duas conformações são possíveis durante o processo de transporte: transportador aberto para o citoplasma (*inward*) e fechado ou aberto para o periplasma (*outward*) (Figura 20). Na conformação *inward*, o transportador está em estado relaxado que aconteceria após o transporte com as ATPases afastadas (Figura 20A). Neste estado, a região das permeases que fica voltada para o periplasma está aproximada, de forma que favorece a interação com a proteína periplasmática por meio de seus dois domínios, e início de um novo transporte. Por outro lado, no estado *outward* (Figura 18B), as ATPases estão aproximadas levando ao afastamento das permeases no lado periplasmático. Esta alteração de conformação desestabilizaria a proteína periplasmática que liberaria o ligante para que este seja introduzido no canal (Figura 20B).

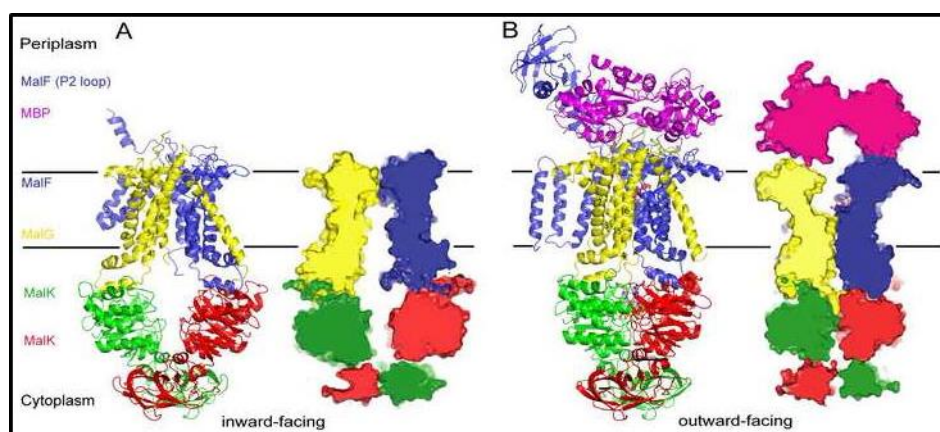


Figura 20 - Organização estrutural do transportador de maltose MalFGK2 de *E. coli* evidenciando as duas conformações clássicas de transportadores ABC. A) Representação em cartoon e em superfície do transportador de maltose MalFGK2 de *E. coli* na conformação aberta, *inward* B) Conformação na forma fechada *outward*. Retirado de Oldham e colaboradores (2007).

4.4.1 O modelo do transportador CysUWA

O papel das proteínas periplasmáticas nestas duas conformações é fundamental, uma vez que ao interagirem com as permeases promovem mudanças conformacionais nas hélices transmembranas (que são interligadas com as ATPases) e sinalizam para que a quebra do ATP ocorra. A energia liberada é suficiente para abrir o canal/poro formado pelas permeases e consequentemente, permitir a entrada do substrato. Para que pudéssemos caracterizar as regiões de interação e fazer uma análise do transportador em detalhe, foi realizada a modelagem molecular por homologia dos componentes do mesmo (Figura 21). Na ausência de um transportador de sulfato com estrutura resolvida, usamos as coordenadas estruturais do transportador de molibdato de *Archaeoglobus fulgidus* (PDB 2ONK, ModABC) [26], pelo fato de ambos transportarem oxianions e serem conservados. A principal diferença entre o transportador de molibdato e o de sulfato é que o primeiro é um homodímero de permeases e o segundo um heterodímero. As permeases do transportador de sulfato, CysU e CysW, quando comparadas com a permease do transportador de molibdato (ModB) mostraram identidade em torno de 28%. O modelo, construído com o programa Modeller, foi estereoquimicamente avaliado com o programa PROCHECK, e funcionalmente, pela localização da sequência assinatura das permeases, ou motivo EAA, expostos na região citoplasmática e em interação direta com as ATPases (Davidson et al., 2008) (Figura 21). Este motivo, característico dos transportadores do tipo importador, são fundamentais para que o processo de transporte ocorra, uma vez que as mudanças de conformação ocorridas nas permeases serão sentidas pelas ATPases, as quais desencadeiam a hidrólise do ATP [94] (Figura 21). Ainda, nas estruturas modelo das permeases CysU e CysW, pudemos identificar as possíveis regiões que devem interagir com a proteína ligadora periplasmática Sbp. As características desta região são importantes para definir a especificidade/afinidade da proteína periplasmática pelo transportador. Na Figura 21A são mostrados os resíduos constituintes das regiões mencionadas, aqui denominadas de R-CysU e R-CysW (Figura 21 B).

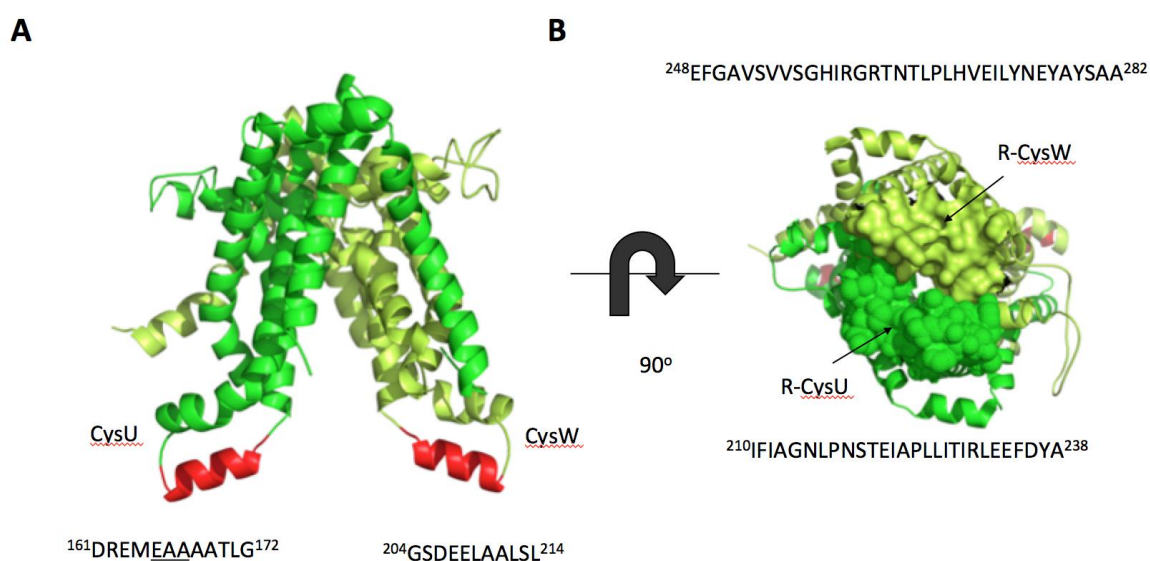


Figura 21 – Modelo da estrutura tri-dimensional das proteínas CysU e CysW de *X. citri*. **A)** as proteínas CysU (verde) e CysW (limão) são organizadas como um heterodímero na conformação *inward* com as regiões de hélices de associação evidenciadas em vermelho. As seqüências de aminoácidos são mostradas para cada região com o motivo EAA sublinhado. **B)** Vista das regiões R-CysU e R-CysW que são exportadas do lado periplasmático e que devem fazer a interação com a proteína periplasmática Sbp.

O modelo das ATPases mostra a formação de um homodímero (Figura 22A, em cinza e bege), cujos domínios conservados envolvidos tanto na interação como na hidrólise do substrato, são evidenciados. Também são demonstradas as seqüências assinatura de transportadores ABC (LSGGQ), o C-Loop, o Q-loop e o H-loop [23, 29, 33, 95].

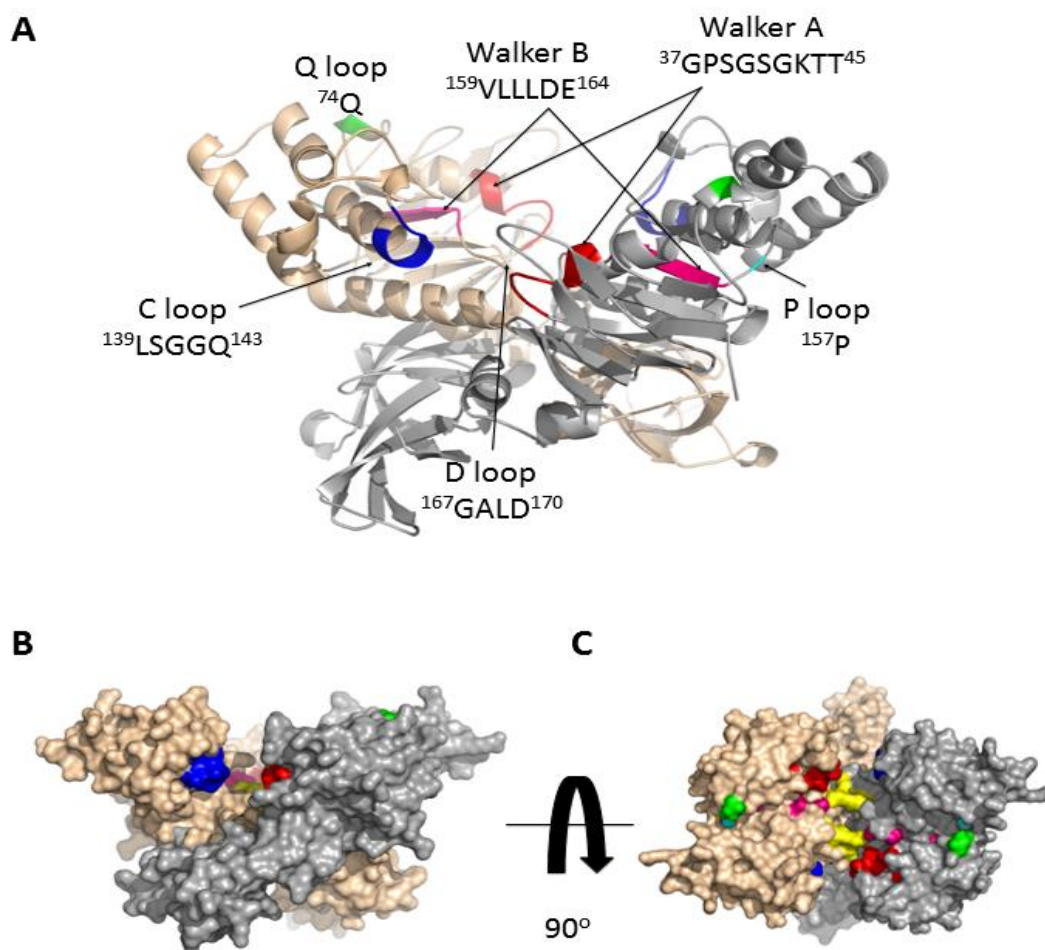


Figura 22 - Modelo da estrutura tri-dimensional das proteínas Cys Ade *X. citri*. A) As proteínas CysA com duas cópias (cinza e bege) são organizadas como um homodímero na conformação e realizam a hidrólise do ATP. As sequências de aminoácidos são mostradas para cada região estão destacadas na Figura B e C) Superfícies das proteínas evidenciando a localização dos motivos clássicos de ATPase bem como a assinatura LSSGQ, identificadora de domínios ATPase de transportadores ABC.

4.4.1 A proteína ligadora periplasmática Sbp

No presente trabalho a análise completa da proteína Sbp está na forma de artigo publicado na revista *Molecular Plant Microbe Interactions* (MPMI) e encontra-se no Anexo 2 desta tese. Em resumo, no nosso modelo, a proteína ligadora Sbp, teve sua estrutura foi resolvida neste trabalho (XAC1017) (Figura 23, em cinza). Ela é a responsável pela afinidade e especificidade do sistema bem como captura do sulfato no periplasma. Na figura abaixo, apresenta-se na conformação fechada, ligada ao substrato, sulfato sugerindo sua interação com as permeases. Essas regiões de interação são localizadas nos domínios N e C, lateralmente à entrada da fenda, e foram denominadas de RI e RII (Figura 21B), respectivamente, para ambos os domínios. Neste sentido, uma vez assumido que o modelo das

permeases era consistente com a literatura [26, 96] foi possível também definir as regiões externas, denominadas MI e MII, que poderiam interagir respectivamente, com as RI e RII da periplasmática (Figura 21B, visualização do potencial eletrostático). Nesta análise, fica evidente a polarização de cargas positivas na interface das periplasmáticas e negativas na interface das proteínas de membrana (Figura 21 C). Estes estudos evidenciam duas possíveis futuras estratégias no desenvolvimento de inibidores de transporte: (i) visando o bloqueio da interação do sulfato com a Sbp no sítio de ligação e (ii) o bloqueio da interação da Sbp com as permeases com foco nas regiões delimitadas. A análise dos resíduos que correspondem às regiões RI e RII nas periplasmáticas encontradas em diferentes espécies de *Xanthomonas* e das regiões MI e MII mostra alto grau de conservação, sugerindo mecanismos semelhantes e também conservados (Figura 24).

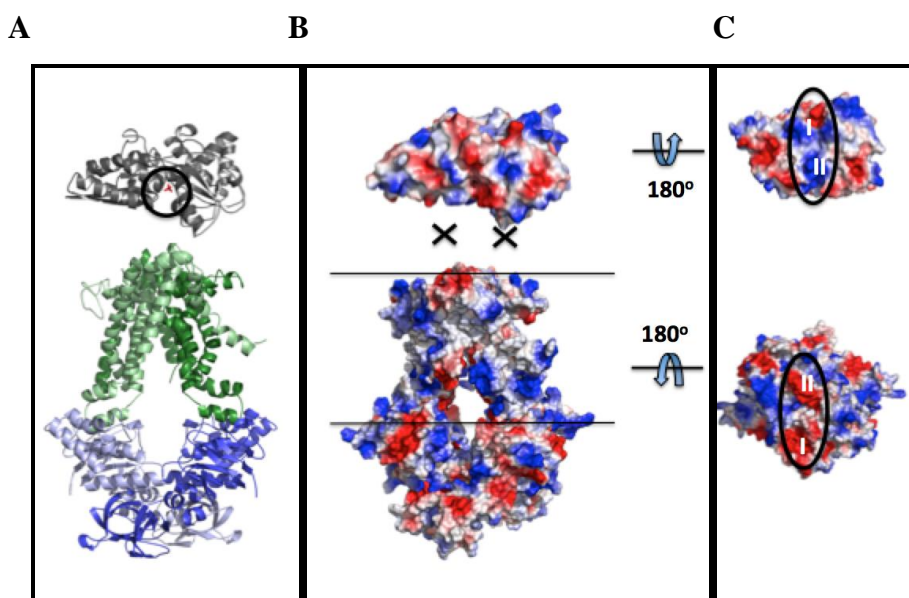


Figura 23 – Modelo do transportador de sulfato de *X. citri* e potencial eletrostático dos seus componentes. O modelo consiste de uma proteína periplasmática (Sbp, em cinza) cuja estrutura foi resolvida pelo nosso grupo, um homodímero de duas permeases (em verde claro e escuro) e homodímero de duas ATPases (em azul claro e escuro) que evidenciam as possíveis regiões de bloqueio do sistema. **(A)** Representação em cartoon do modelo; **(B)** O transportador mostrado do ponto de vista do potencial eletrostático das proteínas evidenciando a região de interação e possível bloqueio (X). **(C)** Vista frontal das regiões RI e RII da Sbp e MI e MII das permeases evidenciando a complementariedade de cargas (positivas, mostradas em azul e negativas mostradas em vermelho) (círculo preto).

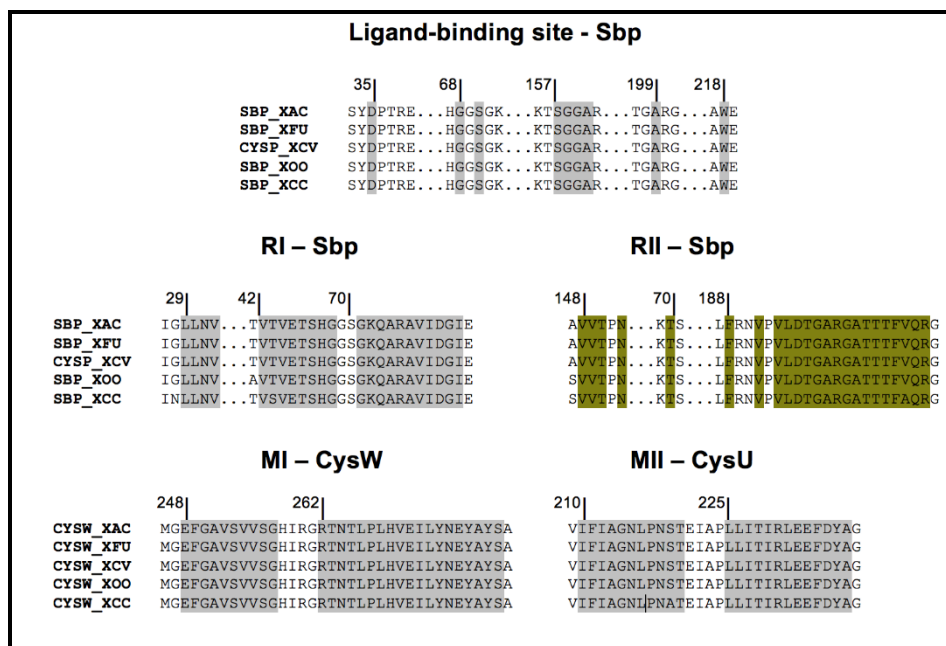


Figura 24 – Alinhamento de sequências de aminoácidos dos componentes do sistema de transporte de sulfato encontrados em diferentes espécies de *Xanthomonas*. Os resíduos envolvidos nas interações com o íon (Sbp) e os que delimitam as regiões de interação e interface entre proteína periplasmática e permeases são iluminados. Cinco espécies de *Xanthomonas* foram usadas no alinhamento realizado com o programa ClustalW: XAC: *X. citri*; XFU: *X. fuscans*; XCV: *X. vesicatoria*; XOO: *X. oryzae* e XCC: *X. campestris*.

A proteína ligadora periplasmática é o quinto componente do transportador de sulfato, responsável pela afinidade e especificidade. Uma vez que sua caracterização funcional já havia sido realizada anteriormente (Pereira, 2013), neste trabalho, a proteína Sbp foi produzida conforme protocolo estabelecido e submetida aos ensaios de cristalização para obtenção de sua estrutura terciária. A busca por cristais foi realizada pelo método da gôta suspensa utilizando os kits de cristalização comerciais Hampton Crystal Screen HT, Salt RX entre outros disponíveis. Os Cristais no formato de bastão foram crescidos em média 6 dias após a preparação das gotas, sempre na presença de sulfato, em tampão MES e pH variando de 6.5 a 7.5. Devido à baixa resolução da difração apresentada por tais cristais, foram realizados ensaios de refinamento os quais geraram cristais bem definidos que difrataram a 3.18 Å na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncronon (LNLS). A condição de crescimento do cristal que difratou continha: Tris HCl 0.1 M pH 7.5, 20% PEG 6000 sendo a concentração da proteína: 8.9 mg/mL em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8.0 contendo 0.3 mM de sulfato de magnésio (Figura 25).

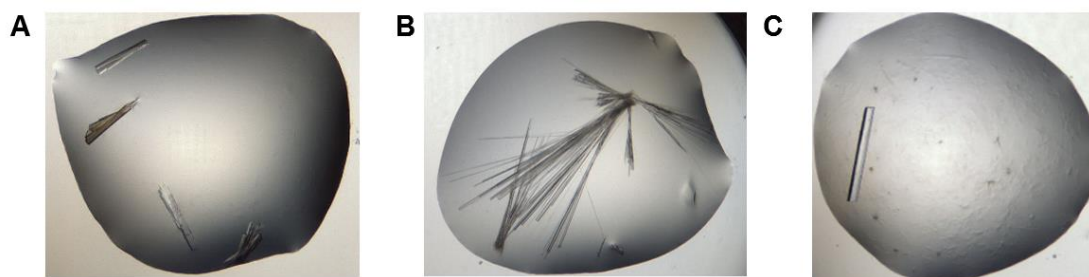


Figura 25 Novos ensaios de cristalização para proteína Sbp. Gotas do tipo suspensas foram realizadas na concentração protéica de 8.9 mg/l e mostraram cristais predominantemente em forma de agulhas **A)** Gota contendo a proteína Sbp em em 35% MPd; 10 mM Tris-HCl pH 7.0; 200 mM de cloreto de sódio. **B)** Gota contendo 0.2 M de iodeto de sódio, 0.1 M Trispropano pH 6.5 e 20% de PEG 3350. **C)** Gota contendo 0.04 M de acetato de sodio pH 4.6 e 40% de PEG 2000.

Após difração dos cristais, o processamento dos dados de difração permitiu a definição do grupo espacial monoclinico P_121_1 . Segundo o coeficiente de Matthews (1968) calculado em $2.19 \text{ \AA}^3/\text{Da}$, o cristal contém 44% de solvente e uma molécula na unidade assimétrica conforme mostrado na Figura 26B . A estrutura cristalina foi resolvida por substituição molecular usando o ortólogo de *Salmonella typhimurium* resolvido a 1.7 \AA (PDB: 1SBP; [63] e que apresenta 65% de identidade. Em ambos os monômeros do modelo final, a estrutura é caracterizada a partir dos resíduos 25 a 338. Os primeiros 24 resíduos não puderam ser resolvidos devido à falta de densidade eletrônica, provavelmente por movimentação desta região. A Tabela 08 expõe as informações fundamentais referente às estatísticas de tratamento e refinamento dos dados.

Tabela 8 de dados de difração do primeiro conjunto de dados a 3.18 \AA *

<i>Dados de difração de Raios X</i>	1 ^o . estrutura	2 ^a . Estrutura (PDB 5UM2)
Synchrotron e linha de luz	LNLS MX2	Diamond Light Source I02
Comprimento de onda (\AA)	1.433	0.979490
Grupo Espacial	P 1 21 1	C 1 2 1
Parâmetros de célula unitária	a= 82.26	a= 183.06
	b = 33.91	b = 54.54
	c = 106.88	c = 34.2
	α = 90.00	α = 90.00
	β = 90.00	β = 98.90
	γ = 90.00	γ = 90.00
Faixa de Resolução (\AA)	35.63 – 3.18	30.16 - 1.14 (1.181 - 1.14)
Rmerge (%)	0.18 (0.52)	0.039 (0.650)
Completeza (%)	97.0 (96.0)	93.3 (70.3)
Redundancia	7.6 (7.5)	3.7 (2.7)
$\langle I/\sigma \rangle$	7.2 (3.0)	15.2 (1.9)
Mosaicidade (deg)	0.75	0.75

Fator Wilson Plot B (\AA^2)	37.4	11.4
<i>Refinamento e qualidade do modelo</i>		
Faixa de resolução (\AA)	46.37 – 3.18	46.37 – 1.08
Número de reflexões: work/test	15046	15046
Rvalue (%)	0.145	0.1776 (0.2933)
Rfree (%)	0.220	0.1905 (0.2981)
Média fator B (\AA)	13.96	18.10

* Os valores em parênteses correspondem aos dados da ultima camada de resolução.

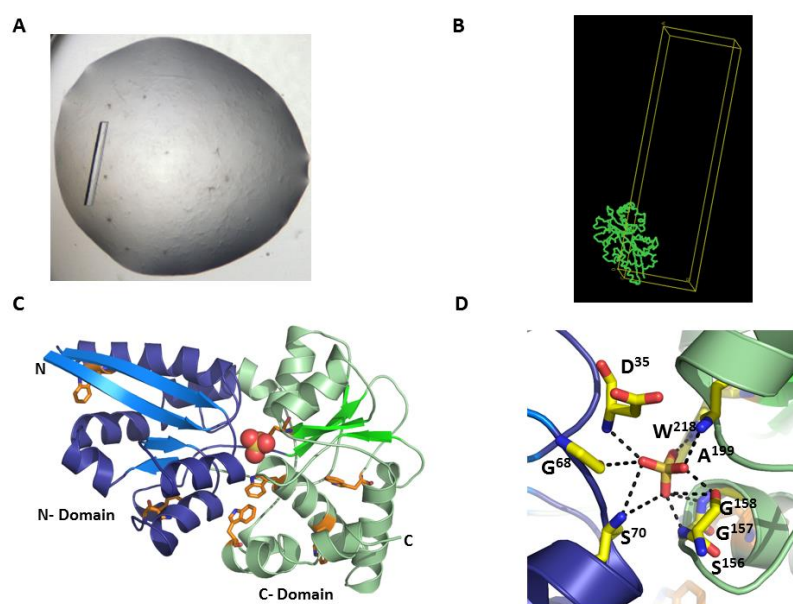


Figura 26– Cristalização, difração e estrutura tridimensional da proteína Sbp de *X. citri*. **A)** Cristal da proteína Sbp obtido na condição 0.1 M de Tris pH 7.5 e 20% PEG 6000. 2 μL da proteína em tampão 0.05 M de Tris pH 8.0 e 0.3 μM de sulfato de magnésio foram misturados a 2 μL da solução mãe para a preparação da gota. **B)** Uma molécula de Sbp encontrada na unidade assimétrica. **C)** Estrutura tridimensional da proteína Sbp mostrando os dois domínios, N (azul) e C-terminal (verde) e o íon sulfato na fenda em forma de esfera vermelha. A localização de todos os triptofanos são mostrados em palitos laranjas. **D)** Detalhe do sítio de ligação de sulfato evidenciando os resíduos envolvidos nas ligações de hidrogênio.

A estrutura da Sbp mostra dois domínios alfa-beta entre os quais encontra-se o sítio de ligação ao sulfato. De fato, a densidade eletrônica permitiu a identificação de uma molécula do ânion exatamente na região do bolsão. Embora altamente conservados, tanto estrutura como o sítio de ligação, novos ensaios de cristalização foram realizados para a otimização da resolução. As novas tentativas foram realizadas com kits da *Hampton Research* com alvo nas variações de pH e aditivos. Foi encontrado um cristal crescido a 18°C na condição com 0.2 M de sulfato de potássio e 20% (v/v) de PEG 3350, pelo método da gota sentada (*sitting drop*), em robô Oryx6 do Departamento de Bioquímica da Universidade de Cambridge. Este cristal

foi submetido à difração de raios-X na linha Diamond Light Source, Oxfordshire usando o detector Pilatus 6M e apresentou resolução melhorada de 1.14 Å (Tabela 08, segundo cristal).

Nesta resolução, além da melhora da qualidade da estrutura e estatísticas, foi possível comparar as duas estruturas e identificar com clareza os resíduos que formam 7 ligações de hidrogênio para coordenação do íon (Figura 27). A estrutura foi depositada no banco de dados PDB (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) com o código 5UM2.

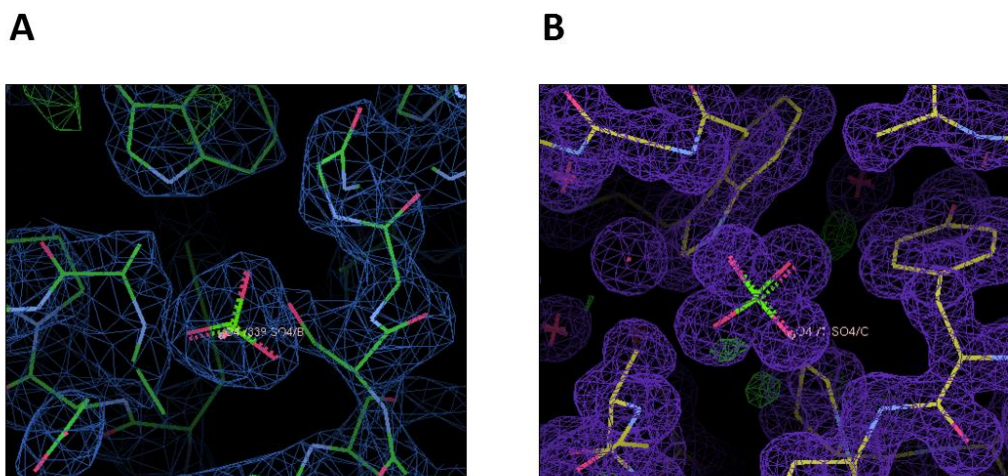


Figura 27 – Densidade eletrônica da proteína Sbp em diferentes resoluções, A) evidenciando a ligação da proteína com o íon sulfato na resolução 3.2 Å B) na melhor resolução em 1.14 Å

Nos dois modelos gerados observa-se, contudo, que a proteína Sbp de *X. citri* conserva a mesma organização característica das proteínas periplasmáticas ligadoras de transportadores ABC com dois domínios separados por uma alça. Esses dois domínios quando fechados capturam o substrato conforme o modelo de flor de Vênus [97]. Sua fenda de ligação com o sulfato é delimitada pelos domínios N e C terminais, cada um compreendendo uma folha β rodeado por hélices alfa, conforme apresentado na Figura 26C. O domínio N é formado pelos resíduos 25-120 e 246-308 organizados em uma folha β com 4 fitas antiparalelas rodeadas por 8 hélices alfa. Similarmente, o domínio C compreende os resíduos 121-25 e 309-338 também constituído de uma folha beta com 5 fitas antiparalelas circundadas por 7 hélices alfa. A interconexão desses domínios envolve a presença de 2 alças (resíduos 121-123 e 242-245) dispostos do lado oposto ao da entrada da fenda. Os resíduos de interação com o sulfato mostraram-se idênticos ao ortólogo de *S. typhimurium* (Figura 26D).

De posse do modelo tridimensional da proteína e a comprovação experimental da ligação com sulfato foram realizados vários ensaios de titulação calorimétrica isotérmica (ITC) a fim de obter experimentalmente a constante de dissociação (K_d) da proteína pelo substrato. Houve também a finalidade de investigar a hipótese levantada na literatura que

algumas proteínas ligadoras de sulfato poderiam se ligar a outros oxianions [98-100]. Conforme a tabela 9, as inúmeras tentativas de obtenção experimental da constante de dissociação foram realizadas sem sucesso. De acordo com a Figura 28 é possível observar a ligação da proteína pelo substrato, porém sua constante não pôde ser calculada devido a rápida saturação, sugerindo que a proteína poderia vir associada ao sulfato já nos ensaios de purificação. Para eliminarmos esta possibilidade, foi realizado o desnovelamento químico da proteína com 8 M e 4 M de uréia, para posterior re-novelamento. Porém, mesmo após a realização deste protocolo não houve medida da interação/ligação nos ensaios calorimétricos.

Tabela 9 - Variações experimentais testadas nos experimentos de ITC da proteína Sbp na presença de sulfato.

Experimento	Concentração proteína	Concentração Ligante	Estratégia de Renovelamento	Temperatura da célula
1	50 μ M	400 μ M	Nenhuma	15 °C
2	70 μ M	400 μ M	Nenhuma	20 °C
3	70 μ M	200 μ M	Nenhuma	15 °C
4	70 μ M	200 μ M	Uréia 8M	15 °C
5	120 μ M	200 μ M	Uréia 4M	15 °C
6	120 μ M	2 mM	Guanidina 6M	15 °C
7	120 μ M	2 mM	Resina Dowex	15 °C
8	170 μ M	200 μ M	Resina Dowex	15 °C
9	120 μ M	200 μ M	Uréia 4M	15 °C
10	90 μ M	200 μ M	Uréia 4M	15 °C

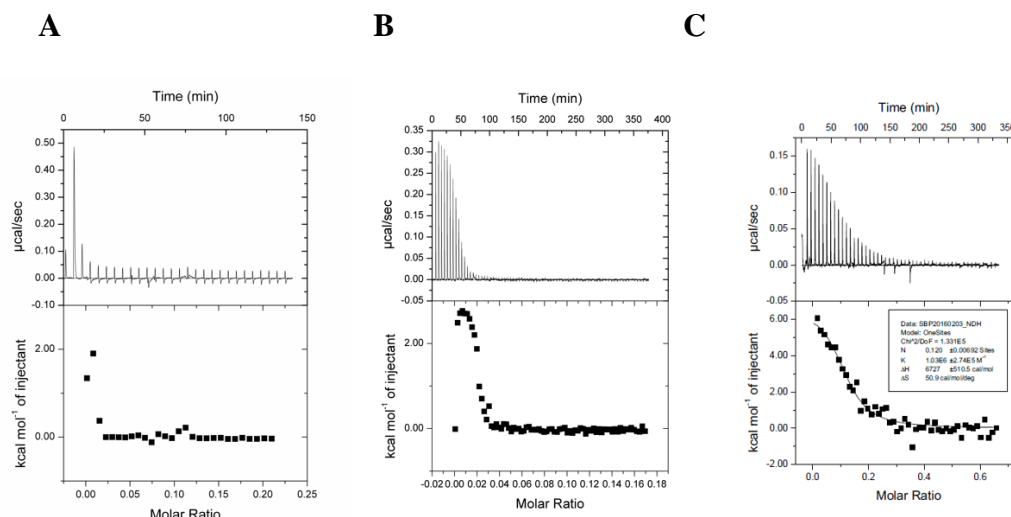


Figura 28 – Figuras representativas das tentativas de titulação calorimétrica da proteína Sbp de *X. citri* evidenciando a ligação da proteína com sulfato de magnésio e subsequente melhoria das injeções, porém sem obtenção de sua constante de afinidade (K_d) A) Experimento número 1 referente Tabela 8 B) Experimento número 2 referente Tabela 8 C). Experimento 03 referente da tabela 08

Como a Sbp apresenta dois resíduos triptofanos nas posições 161 e 218 (Figura 29A), foi possível conseguir a constante de afinidade (K_d) utilizando o método de fluorescência intrínseca de triptofanos. Adicionalmente, foram realizados ensaios na presença de molibdato também, os quais mostraram que Sbp é específica para sulfato, diferentemente da proteína ligadora de sulfatos de *E. coli*, que também liga molibdato com baixa afinidade [98, 100].

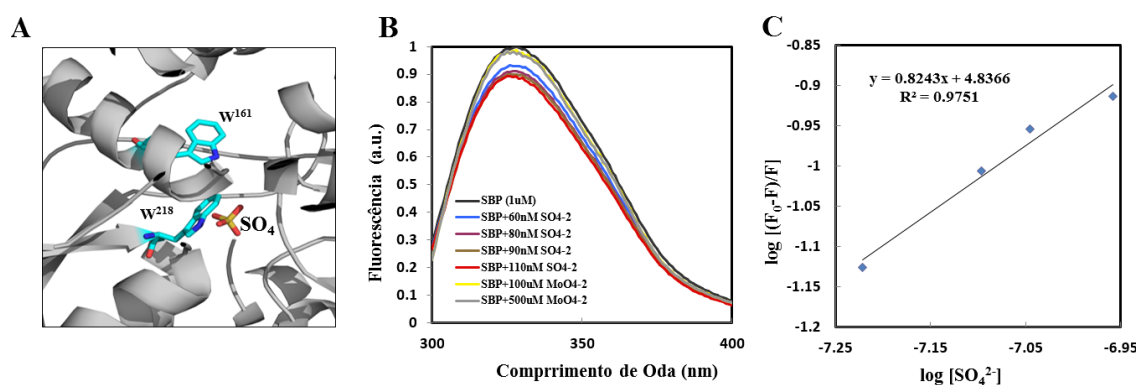


Figura 29– Interação da Sbp de *X. citri* com sulfato analisada por fluorescência intrínseca dos triptofanos. A) Detalhamento do sítio de ligação evidenciando dois triptofanos. B) Espectro de emissão de fluorescência da Sbp (1 μ M) em diferentes concentrações de sulfato e molibdato. Os triptofanos foram excitados a 295 nm a 20°C. C) Determinação da constante de ligação K_b e número de sítios de sulfato para Sbp por meio de métodos fluorimétricos.

4.4.2 Produção das permeases e ATPase do transportador de sulfato de *X. citri* para estudos estruturais

A caracterização estrutural dos componentes deste transportador, o qual consiste de das proteínas de membrana CysU e CysW e a ATPase CysA, envolve a expressão do complexo e solubilização do mesmo em detergentes. Várias estratégias de clonagem foram realizadas no período conforme Tabela 9. Em todas as abordagens, as proteínas foram clonadas na forma completa. Na primeira abordagem, optou-se pela clonagem dos genes completos, nos vetores de expressão conforme Material e Métodos. Em todas as construções as proteínas foram fusionadas à caudas de 6 (CysA) ou 8 histidinas (CysUW).

Os ensaios de produção das proteínas estão apresentados na Tabela 10 e o símbolo NP significa que as proteínas não foram expressas nas condições testadas (Figura 30). Para confirmação dos resultados foi realizado o ensaio de *Western Blot* utilizando o anticorpo primário anti-His (dados não mostrados).

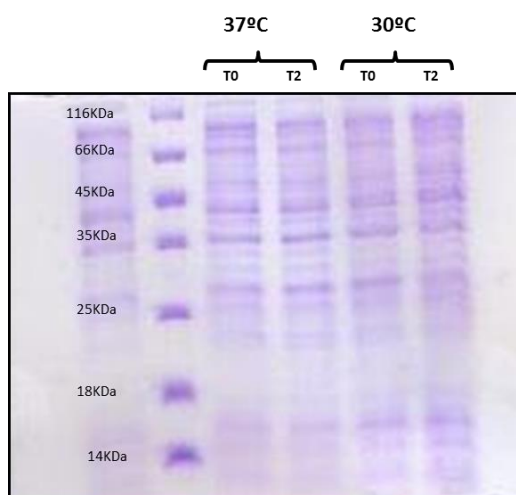


Figura 30 – Resultado representativo dos testes de produção das proteínas CysU, CysW e CysA de *X. citri* em células de *E. coli* C41 (DE3). A figura ilustra a ausência a produção de nenhuma das duas permeases do transportador no tempo indicado como T2 que corresponde 4 horas após a adição do agente indutor IPTG. As massas moleculares esperadas para as proteínas CysU, CysW e CysA são 32.5 KDa, 34.8 KDa e 40 KDa, respectivamente.

Tabela 10 - Tentativas de obtenção das proteínas do transportador em *E.coli*

Proteína	Plasmídeo	Cepa	Temperatura			Aeração		Indutor		
Cys A	pACYC-Duet		18 °C	30 °C	37 °C	25%	50%	0.4 mM	1 mM	
		BL21(DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	
		BL21(DE3)Tumer	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	
		C43 (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	
		C41(DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	
Proteína	Plasmídeo	Cepa	Temperatura			Aeração		Indutor		
Cys A	pET28a		18 °C	30 °C	37 °C	25%	50%	0.4 mM	1mM	
		BL21(DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	
		Rosseta (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	
		C43 (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	
		Lemo (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	
		C41(DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	
Proteína	Plasmídeo	Cepa	Temperatura			Aeração		Indutor		
Cys A	pBAD24		18 °C	30 °C	37 °C	25%	50%	0.05%	0.10%	
		E.coli MC 1061	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
Proteína	Plasmídeo	Cepa	Temperatura			Aeração		Indutor		
Cys A	pHAT2		18 °C	30 °C	37 °C	25%	50%	0.4 mM	1 mM	
		BL21(DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		Rosseta (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		C43 (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		Lemo (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		C41(DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
Proteína	Plasmídeo	Cepa	Temperatura			Aeração		Indutor		
Cys UWA	pET28a		18 °C	30 °C	37 °C	25%	50%	0.4 mM	1 mM	
		BL21(DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		Rosseta (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		C43 (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		Lemo (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		C41(DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
Proteína	Plasmídeo	Cepa	Temperatura			Aeração		Indutor		
Cys U	pET28a		18 °C	30 °C	37 °C	25%	50%	0.4 mM	1 mM	
		BL21(DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		Rosseta (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		C43 (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		Lemo (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		C41(DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
Proteína	Plasmídeo	Cepa	Temperatura			Aeração		Indutor		
Cys W	pET28a		18 °C	30 °C	37 °C	25%	50%	0.4 mM	1 mM	
		BL21(DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		Rosseta (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		C43 (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		Lemo (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		C41(DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
Proteína	Plasmídeo	Cepa	Temperatura			Aeração		Indutor		
Cys UW	pETDuet		18 °C	30 °C	37 °C	25%	50%	0.4 mM	1 mM	
		BL21(DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		Rosseta (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		C43 (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		Lemo (DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
		C41(DE3)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP

A produção heteróloga das proteínas de membrana não foi obtida mesmo após várias tentativas e poderia ser explicada por uma série de fatores como escassez de maquinaria de translocação (tipo SEC ou TAT), toxicidade celular, divergência de sinalização entre espécies e *códon usage* [101-103].

Mediante ao insucesso das tentativas de produção das proteínas de interesse, solicitamos a clonagem das mesmas após otimização dos códons (*códon usage*) para produção em *E. coli*. Os mesmos encontram-se em fase de sub-clonagem em vetores de expressão e testes de produção de proteína recombinante.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho mostrou, pela primeira vez, o levantamento completo sobre proteínas envolvidas com o transporte de sulfato e compostos sulfonados em *X. citri*, com especial atenção aos sistemas de transporte do tipo ABC, provavelmente constituintes do de um regulon *cys*, como identificado em *E. coli*. Mostramos que existem ao menos 3 sistemas ABC de transporte de compostos sulfonados, com especial atenção ao transportador de sulfato SbpCysUWA, cujos ensaios funcionais mostraram que o mesmo não é essencial para o processo de formação do cancro de forma geral, mas está relacionado de alguma forma à deficiência de xantomonadina. A não essencialidade do sistema poderia ser explicada pela redundância no genoma de *X. citri* caracterizada pela presença de outras duas famílias de proteínas carreadoras tipo SLC (13 e 26), as quais poderiam complementar a função do transportador SbpCysUWA. De fato, os resultados de RT-PCR mostram que os genes correspondentes aos putativos transportadores SulP e SacI podem ser diferencialmente expressos em LB e XAM1. Os resultados não permitem atribuir funções aos transportadores, mas as análises de bioinformática sugerem similaridade com sistemas de baixa e alta afinidade por oxiânions. Juntamente, estes transportadores, associados aos aqueles relacionados ao transporte de compostos sulfonados (sistemas Ssu1 e Ssu2) mostram alta redundância e reforçam que enxofre é elemento essencial para a bactéria, durante o crescimento e processos de infecção na planta. A bactéria mostra-se bem adaptada neste sentido.

Em relação à parte estrutural, conseguimos mostrar a conservação das proteínas de membrana e caracterizar a estrutura tridimensional do componente periplasmático do sistema transportador, a proteína ligadora periplasmática Sbp, com alta resolução a 1.14 Å. Como proteínas periplasmáticas são exclusivas de procariotos, elas se tornam alvos interessantes para o desenvolvimento de inibidores de crescimento. Infelizmente, como em *X. citri* o sistema ABC de sulfato não é o único responsável pela captação do enxofre, a estratégia para o desenvolvimento de inibidores deveria se basear não somente na proteína periplasmática, mas em um inibidor do tipo sulfonado, de forma que pudesse ser capturado por qualquer um dos transportadores e se ligar covalentemente aos mesmos.

Os resultados gerados como fruto deste trabalho [6, 57, 104, 105], associados aos resultados publicados pelo grupo em relação aos transportadores de molibdato, fosfato e alceno sulfonatos [40, 58, 106-108] formam uma sólida base sobre a funcionalidade e

estruturas dos sistemas de captação de ânions em *X. citri*, que devem ser compilados para constituição de uma revisão no tema.

Finalmente, nosso grupo tem especial interesse na resolução das estruturas dos transportadores do tipo SulP e SacI e seus estudos funcionais e dará continuidade ao trabalho.

6. REFERÊNCIAS

1. CitrusBr, *Anuário da Citricultura*. 2017.
2. USDA, Disponível em http://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/planthealth/plant-pest-and-disease-programs/pests-and-diseases/citrus-health-response-program/ct_citrus_canker/!ut/p/z1/04_iUIDg4tKPAFJABpSA0fpReYllmemJJZn5eYk5-hH6kVFm8X6Gzu4GFiaGPu6uLoYGjh6Wnt4e5mYGwX4m-l5giOj9IBPw64iA6oAqh1P6kUZFvs6-6fpRBYklGbqZeWn5-hHJJfHJmSVFpcXxyYl52alF-gXZUZEAdwaXgw!!/ Acesso 01.Set2017. 2016.
3. MIRANDA, S.H.G., BASSANEZI, R. B., ADAMI, A. C.O. , *ABC das ações de defesa fitossanitária para o HLB em São Paulo: lições para a citricultura do Nordeste*. Bahia Agrícola, 2011. **9**(1): p. . 64-71.
4. Brunings, A.M. and D.W. Gabriel, *Xanthomonas citri: breaking the surface*. Mol Plant Pathol, 2003. **4**(3): p. 141-57.
5. Pitino, M., C.M. Armstrong, and Y. Duan, *Rapid screening for citrus canker resistance employing pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity responses*. Horti Res, 2015. **2**: p. 15042.
6. Tofoli de Araujo, F., et al., *Structural and physiological analyses of the alkanesulphonate-binding protein (SsuA) of the citrus pathogen Xanthomonas citri*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80083.
7. FUNDECITRUS, <http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/nova-legislacao-de-controle-de-cancro-citrico-em-sao-paulo-entra-em-vigor-em-4-de-marco/513>. 2017. Acesso em 13 jan 2018.
8. Schaad, N.W., et al., *Reclassification of Xanthomonas campestris pv. citri (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as X. smithii subsp. citri (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., X. fuscans subsp. aurantifolii (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and X. alfalfae subsp. citrumelo (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; X. campestris pv. malvacearum (ex smith 1901) Dye 1978 as X. smithii subsp. smithii nov. comb. nov. nom. nov.; X. campestris pv. alfalfae (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as X. alfalfae subsp. alfalfae (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. fuscans" of X. campestris pv. phaseoli (ex Smith, 1987) Dye 1978 as X. fuscans subsp. fuscans sp. nov.* Syst Appl Microbiol, 2005. **28**(6): p. 494-518.
9. Schaad, N.W., et al., *Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus*. Syst Appl Microbiol, 2006. **29**(8): p. 690-5.
10. GALLI, F.C., P.C.T.; TOKESHI, H.; BALMER, F.; KIMATI, H.; C.O.S. CARDOSO, C.L.; KRUGNER, T.L.; CARDOSO, E.J.B.N.; and F.A. BERGAMIN, *Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas*. . São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. **2**.
11. Lopes, R., et al., *Linkage and mapping of resistance genes to Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae in yellow passion fruit*. Genome, 2006. **49**(1): p. 17-29.
12. Kim, J.G., et al., *Characterization of the Xanthomonas axonopodis pv. glycines Hrp pathogenicity island*. J Bacteriol, 2003. **185**(10): p. 3155-66.
13. da Silva, A.C., et al., *Comparison of the genomes of two Xanthomonas pathogens with differing host specificities*. Nature, 2002. **417**(6887): p. 459-63.
14. Lorenzoni, A.S.G., et al., *Xanthomonas citri MinC Oscillates from Pole to Pole to Ensure Proper Cell Division and Shape*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 1352.
15. Dunne, W.M., Jr., *Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?* Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(2): p. 155-66.
16. Cernadas, R.A., L.R. Camillo, and C.E. Benedetti, *Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens Xanthomonas axonopodis pv. citri and Xanthomonas axonopodis pv. aurantifolii*. Mol Plant Pathol, 2008. **9**(5): p. 609-31.
17. Rigano, L.A., et al., *Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in Xanthomonas axonopodis pv. citri*. Mol Plant Microbe Interact, 2007. **20**(10): p. 1222-30.

18. Ballottin, D., et al., *Antimicrobial textiles: Biogenic silver nanoparticles against Candida and Xanthomonas*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **75**: p. 582-589.
19. Fatima, U. and M. Senthil-Kumar, *Plant and pathogen nutrient acquisition strategies*. Front Plant Sci, 2015. **6**: p. 750.
20. Zerbs, S., et al., *Transport capabilities of environmental Pseudomonads for sulfur compounds*. Protein Sci, 2017. **26**(4): p. 784-795.
21. Tanaka, K.J., et al., *Selective substrate uptake: The role of ATP-binding cassette (ABC) importers in pathogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2017.
22. Lewis, V.G., M.P. Ween, and C.A. McDevitt, *The role of ATP-binding cassette transporters in bacterial pathogenicity*. Protoplasma, 2012. **249**(4): p. 919-42.
23. Davidson, A.L., et al., *Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems*. Microbiol Mol Biol Rev, 2008. **72**(2): p. 317-64, table of contents.
24. Berntsson, R.P., et al., *A structural classification of substrate-binding proteins*. FEBS Lett, 2010. **584**(12): p. 2606-17.
25. Scheepers, G.H., A.N.J.A. Lycklama, and B. Poolman, *An updated structural classification of substrate-binding proteins*. FEBS Lett, 2016. **590**(23): p. 4393-4401.
26. Hollenstein, K., D.C. Frei, and K.P. Locher, *Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein*. Nature, 2007. **446**(7132): p. 213-6.
27. Vigonsky, E., E. Ovcharenko, and O. Lewinson, *Two molybdate/tungstate ABC transporters that interact very differently with their substrate binding proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(14): p. 5440-5.
28. Oldham, M.L. and J. Chen, *Crystal structure of the maltose transporter in a pretranslocation intermediate state*. Science, 2011. **332**(6034): p. 1202-5.
29. Locher, K.P., *Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009. **364**(1514): p. 239-45.
30. Locher, K.P., *Structure and mechanism of ABC transporters*. Curr Opin Struct Biol, 2004. **14**(4): p. 426-31.
31. Joseph, B., et al., *Transmembrane gate movements in the type II ATP-binding cassette (ABC) importer BtuCD-F during nucleotide cycle*. J Biol Chem, 2011. **286**(47): p. 41008-17.
32. Weng, J., K. Fan, and W. Wang, *The conformational transition pathways of ATP-binding cassette transporter BtuCD revealed by targeted molecular dynamics simulation*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30465.
33. ter Beek, J., A. Guskov, and D.J. Slotboom, *Structural diversity of ABC transporters*. J Gen Physiol, 2014. **143**(4): p. 419-35.
34. Beis, K., *Structural basis for the mechanism of ABC transporters*. Biochem Soc Trans, 2015. **43**(5): p. 889-93.
35. Mireku, S.A., et al., *Conformational Change of a Tryptophan Residue in BtuF Facilitates Binding and Transport of Cobinamide by the Vitamin B12 Transporter BtuCD-F*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 41575.
36. Taylor, N.M.I., et al., *Structure of the human multidrug transporter ABCG2*. Nature, 2017. **546**(7659): p. 504-509.
37. Kemner, J.M., X. Liang, and E.W. Nester, *The Agrobacterium tumefaciens virulence gene chvE is part of a putative ABC-type sugar transport operon*. J Bacteriol, 1997. **179**(7): p. 2452-8.
38. Li, C., et al., *A novel manganese efflux system, YebN, is required for virulence by Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21983.
39. Luz, D.E., et al., *The Pst system of Streptococcus mutans is important for phosphate transport and adhesion to abiotic surfaces*. Mol Oral Microbiol, 2012. **27**(3): p. 172-81.
40. Pegos, V.R., et al., *Phosphate regulated proteins of Xanthomonas citri subsp. citri: a proteomic approach*. J Proteomics, 2014. **108**: p. 78-88.
41. Soares, M.R., et al., *Proteome of the phytopathogen Xanthomonas citri subsp. citri: a global expression profile*. Proteome Sci, 2010. **8**: p. 55.
42. Beinert, H., *A tribute to sulfur*. Eur J Biochem, 2000. **267**(18): p. 5657-64.
43. Campanini, B., et al., *Inhibitors of the sulfur assimilation pathway in bacterial pathogens as enhancers of antibiotic therapy*. Curr Med Chem, 2015. **22**(2): p. 187-213.

44. Senaratne, R.H., et al., *5'-Adenosinephosphosulphate reductase (CysH) protects Mycobacterium tuberculosis against free radicals during chronic infection phase in mice*. Mol Microbiol, 2006. **59**(6): p. 1744-53.
45. Guillouard, I., et al., *Identification of Bacillus subtilis CysL, a regulator of the cysJI operon, which encodes sulfite reductase*. J Bacteriol, 2002. **184**(17): p. 4681-9.
46. Eichhorn, E., J.R. van der Ploeg, and T. Leisinger, *Characterization of a two-component alkanesulfonate monooxygenase from Escherichia coli*. J Biol Chem, 1999. **274**(38): p. 26639-46.
47. Stec, E., et al., *Structural basis of the sulphate starvation response in E. coli: crystal structure and mutational analysis of the cofactor-binding domain of the Cbl transcriptional regulator*. J Mol Biol, 2006. **364**(3): p. 309-22.
48. Bankov, I., A. Timanova, and J. Barrett, *Methionine and cysteine metabolism in Fasciola hepatica*. Int J Parasitol, 1996. **26**(12): p. 1401-4.
49. Walker, J. and J. Barrett, *Parasite sulphur amino acid metabolism*. Int J Parasitol, 1997. **27**(8): p. 883-97.
50. Nozaki, T., V. Ali, and M. Tokoro, *Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa*. Adv Parasitol, 2005. **60**: p. 1-99.
51. Lestrade, P., et al., *Identification and characterization of in vivo attenuated mutants of Brucella melitensis*. Mol Microbiol, 2000. **38**(3): p. 543-51.
52. Bogdan, J.A., et al., *Bordetella pertussis autoregulates pertussis toxin production through the metabolism of cysteine*. Infect Immun, 2001. **69**(11): p. 6823-30.
53. Yang, Z., et al., *Molecular and genetic analysis of the Cryptococcus neoformans MET3 gene and a met3 mutant*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 8): p. 2617-25.
54. Ejim, L.J., et al., *Cystathionine beta-lyase is important for virulence of Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Infect Immun, 2004. **72**(6): p. 3310-4.
55. Sasseti, C.M., D.H. Boyd, and E.J. Rubin, *Comprehensive identification of conditionally essential genes in mycobacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(22): p. 12712-7.
56. Wooff, E., et al., *Functional genomics reveals the sole sulphate transporter of the Mycobacterium tuberculosis complex and its relevance to the acquisition of sulphur in vivo*. Mol Microbiol, 2002. **43**(3): p. 653-63.
57. Pereira, C.T., et al., *The sulfur/sulfonates transport systems in Xanthomonas citri pv. citri*. BMC Genomics, 2015. **16**: p. 524.
58. Sampaio, A., et al., *The periplasmic binding protein NrtT affects xantham gum production and pathogenesis in Xanthomonas citri*. FEBS Open Bio, 2017. **7**(10): p. 1499-1514.
59. Jovanovic, M., et al., *The LysR-type transcriptional regulator CysB controls the repression of hslJ transcription in Escherichia coli*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 12): p. 3449-59.
60. Kabsch, W., *Xds*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 2): p. 125-32.
61. Winn, M.D., et al., *Overview of the CCP4 suite and current developments*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2011. **67**(Pt 4): p. 235-42.
62. Vagin, A. and A. Teplyakov, *Molecular replacement with MOLREP*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 1): p. 22-5.
63. He, J.J. and F.A. Quirocho, *Dominant role of local dipoles in stabilizing uncompensated charges on a sulfate sequestered in a periplasmic active transport protein*. Protein Sci, 1993. **2**(10): p. 1643-7.
64. Murshudov, G.N., et al., *REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2011. **67**(Pt 4): p. 355-67.
65. de Lorimier, R.M., et al., *Construction of a fluorescent biosensor family*. Protein Sci, 2002. **11**(11): p. 2655-75.
66. Liu, X., et al., *Molecular Modeling and Spectroscopic Studies on the Interaction of Transresveratrol with Bovine Serum Albumin*. Journal of Chemistry, 2013. **2013**: p. 7.
67. Laia, M.L., et al., *New genes of Xanthomonas citri subsp. citri involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library*. BMC Microbiol, 2009. **9**: p. 12.
68. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
69. Dickon, A., *To be publish*.

70. Andrade, M.O., C.S. Farah, and N. Wang, *The post-transcriptional regulator rsmA/csrA activates T3SS by stabilizing the 5' UTR of hrpG, the master regulator of hrp/hrc genes, in Xanthomonas*. PLoS Pathog, 2014. **10**(2): p. e1003945.
71. Sambrook J, R.D., *Molecular Cloning*. 2001.
72. Vojnov, A.A., et al., *Evidence for a role for the gumB and gumC gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by Xanthomonas campestris*. Microbiology, 1998. **144** (Pt 6): p. 1487-93.
73. Starr, M.P. and W.L. Stephens, *Pigmentation and Taxonomy of the Genus Xanthomonas*. J Bacteriol, 1964. **87**: p. 293-302.
74. Sirko, A., et al., *Sulfate and thiosulfate transport in Escherichia coli K-12: evidence for a functional overlapping of sulfate- and thiosulfate-binding proteins*. J Bacteriol, 1995. **177**(14): p. 4134-6.
75. Sirko, A., et al., *Sulfate and thiosulfate transport in Escherichia coli K-12: nucleotide sequence and expression of the cystTWAM gene cluster*. J Bacteriol, 1990. **172**(6): p. 3351-7.
76. Eichhorn, E., J.R. van der Ploeg, and T. Leisinger, *Deletion analysis of the Escherichia coli taurine and alkanesulfonate transport systems*. J Bacteriol, 2000. **182**(10): p. 2687-95.
77. Laudenbach, D.E. and A.R. Grossman, *Characterization and mutagenesis of sulfur-regulated genes in a cyanobacterium: evidence for function in sulfate transport*. J Bacteriol, 1991. **173**(9): p. 2739-50.
78. van Der Ploeg, J.R., et al., *The Escherichia coli ssuEADCB gene cluster is required for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates and is regulated by the transcriptional activator Cbl*. J Biol Chem, 1999. **274**(41): p. 29358-65.
79. van der Ploeg, J.R., et al., *Involvement of CysB and Cbl regulatory proteins in expression of the tauABCD operon and other sulfate starvation-inducible genes in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1997. **179**(24): p. 7671-8.
80. van der Ploeg, J.R., et al., *Identification of sulfate starvation-regulated genes in Escherichia coli: a gene cluster involved in the utilization of taurine as a sulfur source*. J Bacteriol, 1996. **178**(18): p. 5438-46.
81. Kertesz, M.A., *Bacterial transporters for sulfate and organosulfur compounds*. Res Microbiol, 2001. **152**(3-4): p. 279-90.
82. Kertesz, M.A., *Riding the sulfur cycle--metabolism of sulfonates and sulfate esters in gram-negative bacteria*. FEMS Microbiol Rev, 2000. **24**(2): p. 135-75.
83. Aguilera, A. and B. Gomez-Gonzalez, *Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(3): p. 204-17.
84. Hoffmann, M.C., et al., *Bacterial PerO Permeases Transport Sulfate and Related Oxyanions*. J Bacteriol, 2017. **199**(14).
85. Hoglund, P.J., et al., *The solute carrier families have a remarkably long evolutionary history with the majority of the human families present before divergence of Bilaterian species*. Mol Biol Evol, 2011. **28**(4): p. 1531-41.
86. Lamothe, S.M. and S. Zhang, *Chapter Five - Ubiquitination of Ion Channels and Transporters*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2016. **141**: p. 161-223.
87. Schweikhard, E.S. and C.M. Ziegler, *Amino acid secondary transporters: toward a common transport mechanism*. Curr Top Membr, 2012. **70**: p. 1-28.
88. Hediger, M.A., et al., *The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins* Introduction. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 465-8.
89. Ohana, E., et al., *Diverse transport modes by the solute carrier 26 family of anion transporters*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 10): p. 2179-85.
90. Geertsma, E.R., et al., *Structure of a prokaryotic fumarate transporter reveals the architecture of the SLC26 family*. Nat Struct Mol Biol, 2015. **22**(10): p. 803-8.
91. Gisin, J., et al., *A Rhodobacter capsulatus member of a universal permease family imports molybdate and other oxyanions*. J Bacteriol, 2010. **192**(22): p. 5943-52.
92. Bergeron, M.J., et al., *SLC13 family of Na(+)-coupled di- and tri-carboxylate/sulfate transporters*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(2-3): p. 299-312.

93. Chang, J.M., et al., *Accurate multiple sequence alignment of transmembrane proteins with PSI-Coffee*. BMC Bioinformatics, 2012. **13 Suppl 4**: p. S1.
94. Higgins, C.F., *ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview*. Res Microbiol, 2001. **152**(3-4): p. 205-10.
95. Locher, K.P., *Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters*. Nat Struct Mol Biol, 2016. **23**(6): p. 487-93.
96. Rees, D.C., E. Johnson, and O. Lewinson, *ABC transporters: the power to change*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(3): p. 218-27.
97. Quioco, F.A. and P.S. Ledvina, *Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes*. Mol Microbiol, 1996. **20**(1): p. 17-25.
98. Dudev, T. and C. Lim, *Oxyanion selectivity in sulfate and molybdate transport proteins: an ab initio/CDM study*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(33): p. 10296-305.
99. Bourassa, P., et al., *Resveratrol, genistein, and curcumin bind bovine serum albumin*. J Phys Chem B, 2010. **114**(9): p. 3348-54.
100. Aguilar-Barajas, E., et al., *Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions*. Biometals, 2011. **24**(4): p. 687-707.
101. Wagner, S., et al., *Rationalizing membrane protein overexpression*. Trends Biotechnol, 2006. **24**(8): p. 364-71.
102. Zhang, Z., et al., *High-level production of membrane proteins in E. coli BL21(DE3) by omitting the inducer IPTG*. Microb Cell Fact, 2015. **14**: p. 142.
103. Zorman, S., et al., *Advances and challenges of membrane-protein complex production*. Curr Opin Struct Biol, 2015. **32**: p. 123-30.
104. Pereira, C.T., et al., *Sulfate-Binding Protein (Sbp) from Xanthomonas citri: Structure and Functional Insights*. Mol Plant Microbe Interact, 2017: p. MPMI02170032R.
105. Pereira, C.T.O., M. Pena, P. Guerra, G. Oliveira, B. ; Balan, A., *The role of ABC transporters in Xanthomonas citri*. in prep.
106. Santacruz-Perez, C., et al., *A specific interdomain interaction preserves the structural and binding properties of the ModA protein from the phytopathogen Xanthomonas citri domain interaction and transport in ModA*. Arch Biochem Biophys, 2013. **539**(1): p. 20-30.
107. Pegos, V.R., F.J. Medrano, and A. Balan, *Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the phosphate-binding protein PhoX from Xanthomonas citri*. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2014. **70**(Pt 12): p. 1604-7.
108. Pegos, V.R., et al., *Structural features of PhoX, one of the phosphate-binding proteins from Pho regulon of Xanthomonas citri*. PLoS One, 2017. **12**(5): p. e0178162.

ANEXO 01- The sulfur/sulfonates transport systems in *Xanthomonas citri*

RESEARCH ARTICLE

Open Access



The sulfur/sulfonates transport systems in *Xanthomonas citri* pv. *citri*

Cristiane Tambascia Pereira^{1,2}, Alexandre Moutran², Melissa Fessel² and Andrea Balan^{1*}

Abstract

Background: The *Xanthomonas citri* pv. *citri* (*X. citri*) is a phytopathogenic bacterium that infects different species of citrus plants where it causes canker disease. The adaptation to different habitats is related to the ability of the cells to metabolize and to assimilate diverse compounds, including sulfur, an essential element for all organisms. In *Escherichia coli*, the necessary sulfur can be obtained by a set of proteins whose genes belong to the *cys* regulon. Although the *cys* regulon proteins and their importance have been described in many other bacteria, there are no data related to these proteins in *X. citri* or in the *Xanthomonas* genus. The study of the relevance of these systems in these phytopathogenic bacteria that have distinct mechanisms of infection is one essential step toward understanding their physiology. In this work, we used bioinformatics, molecular modeling and transcription analysis (RT-PCR) to identify and characterize the putative *cys* regulon genes in *X. citri*.

Results: We showed that the ATP Binding Cassette Transporter (ABC transporter) SbpCysUWA for sulfate uptake is conserved in *X. citri* and translated in presence of sulfate. On the other hand, differently from what is predicted in databases, according molecular modeling and phylogenetic analysis, *X. citri* does not show a proper taurine transporter, but two different ABC systems related to the alkanesulfonate/sulfonate transport that were recently acquired during evolution. RT-PCR analysis evidenced that these genes and their putative transcriptional regulator CysB are rather transcribed in XAM1, a medium with defined concentration of sulfate, than LB.

Conclusions: The presence of at least three distinct systems for sulfate and sulfonates assimilation in *X. citri* evidenced the importance of these compounds for the bacterium. The transcription of genes involved with alkanesulfonate/sulfur compounds in XAM1 along to CysB suggests that despite the differences in the transporters, the regulation of these systems might be similar to the described for *E. coli*. Altogether, these results will serve as a foundation for further studies aimed to understanding the relevance of sulfur in growth, virulence and pathogenesis of *X. citri* and related bacteria.

Keywords: *cys* regulon, *Xanthomonas citri*, Sulfate, Alkanesulfonate transport, ABC transporter

Background

The plant-associated bacteria from the *Xanthomonas* genus exhibit a high degree of host plant specificity when invading diverse tissues and causing different types of diseases [12]. Comparative genomic analysis has provided insights into the role of horizontal gene transfer and the understanding of the pathogenic adaptations in this genus [40]. *X. citri* is one of the relevant species

from the genus because it is the causative agent of the citrus canker, a disease that affects citrus plants and causes significant economic losses in Brazil and many other countries in the world. Although studies have demonstrated the importance of specific genes for biofilm formation [23], infection [20] and pathogenesis [30], there is a lack of information regarding the sulfur or sulfate assimilation pathways in this bacterium and the relevance of these compounds for infection and pathogenesis.

In *Escherichia coli*, the *cys* regulon genes encode a set of proteins that are associated with the acquisition of sulfate and organosulfur compounds, such as sulfonates

* Correspondence: abalan@usp.br

¹Laboratório de Biologia Estrutural Aplicada, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, Cidade Universitária, São Paulo, SP CEP 05508-000, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

(R-SO₃⁻) and sulfate esters (RO-SO₃⁻), as sulfur source for cysteine biosynthesis. The preferable source of sulfur is sulfate, which is transported by the ABC transporter SbpCysAUW. Once the sulfate assimilation is completed, CysNCDH proteins reduce it to sulfite, and the CysGII complex reduces sulfite to sulfide [14]. In sulfate or cysteine starvation, the operons *ssuABCDE* and *tauABCD* are induced to constitute two ABC transporters that are required for uptake of alkanesulfonate (SsuABC) and taurine (TauABC), respectively, as well as the enzymes for the desulfonation of the organosulfonates (SsuDE and TauD, respectively) [9, 38]. The regulation of these genes is mediated by Cbl and CysB proteins, which consist of two LysR-type transcriptional activators [31, 37, 39]. CysB is the regulator for sulfur assimilation in *E. coli*, while the Cbl protein functions as an accessory element that is specific for the utilization of sulfur from organosulfur sources [39], activating the expression of the *tau* and *ssu* genes. Both regulators are closely related, sharing 41 % sequence identity and 60 % similarity [31].

The presence and importance of these systems have been shown for several bacterial species such as *Salmonella typhimurium* [35], *Pseudomonas aeruginosa* [13], *Bacillus subtilis* [11], and *Acidithiobacillus ferrooxidans* [36]. In addition, sulfated metabolites have been implicated in the interactions between bacteria and their eukaryotic hosts, including species of the plant symbiont genus *Rhizobium* [5], *Mycobacterium tuberculosis* [16] and *Xanthomonas oryzae* [6]. Recently, our group has expressed, purified and solved the three-dimensional structure of the alkanesulfonate-binding protein SsuA bound to three different alkanesulfonates. Through the monitoring of growth, infection and pathogenesis in *Citrus sinensis* leaves, we showed the importance of an alkanesulfonate binding protein for the growth, infection and production of xanthan gum and the development of the canker citric phenotype [2].

Based on the previous information that has been described for *E. coli* and other microorganisms, we carried out bioinformatics and transcriptional analyses (RT-PCR) of *X. citri* to identify the putative *cys* regulon components. The genes belonging to the *cys* regulon in *E. coli* were used as template for a BlastP search against to *X. citri* genome. The protein sequences were compared and modeled, and the putative motifs and domains were characterized. Moreover, the transcription of genes belonging to the ABC transporters and some genes from *cys* pathway and *ssu* operons was evidenced by RT-PCR, suggesting they are required for the bacterial growth. Using this information, we were able to develop a model for sulfur assimilation in *X. citri* evidencing the expression of genes of the sulfate uptake and sulfur assimilation pathway. Moreover, the data show that *X. citri*

presents significant differences related to the systems for uptake of aliphatic sulfonates and alkanesulfonates, as well as the ability to use sulfate- and sulfur-reduced compounds as sources of energy.

Methods

Search for *cys* regulon gene orthologs, sequence alignment and phylogenetic analysis

The genes belonging to the *cys* regulon in *E. coli*, as previously described [9, 14, 37–39], were obtained from the KEGG2 server (Bioinformatics Center Institute for Chemical Research Kyoto University, www.genome.jp) and used to perform a basic local alignment search BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) against the *X. citri* (TaxId: 346) genome database (Additional file 1: Table A1). All the default parameters of the program were used. The amino acid sequence alignments were carried out using ClustalX [34] and edited with GeneDoc [18]. To build the phylogenetic tree of the periplasmic components from the ABC transporters related to sulfate or sulfonates uptake found in *X. citri*, the gene sequences of the periplasmic proteins [*ssuA1* (GeneID: 1154920), *ssuA2* (GeneID: 1157269) and *sbp* (GeneID: 1155088)] were submitted to the BlastP using the non-redundant sequence database. The criterion of choice of the proteins and microorganisms was based on the diversity of genus and similarity of function of the proteins. Description of the hosts and sequences is shown in Additional file 2: Table A2. Phylogenetic reconstruction and molecular evolutionary analyses were conducted with MEGA version 5 [33], using the neighbor-joining statistical method, *p*-distance to estimate the evolutionary distances, and 1000 Bootstrap Replications [24]. All the gaps were treated as a complete deletion. The tree that shows the conservation of the *cys* regulon genes in different phylogenetic groups was built based on the 16S rDNA sequences from the microorganisms described in Additional file 3: Table A3. All the organisms with complete genome sequences were named in agreement with the codes of the KEGG Organisms Complete Genomes table. To name the microorganisms whose genomes were incomplete or absent, we used the capital first letter of the genus followed by two or three first letters from the species.

Molecular modeling

Molecular modeling of the proteins SsuA1, SflA and SsuD1 was performed using the Modeller 9v4 program [25] with basic (for one template) or advanced (for more than one template) scripts (<http://salilab.org/modeller/tutorial/>). A total of 10 models were generated for each target protein, and the best model was selected using the lowest value of the objective function curve. The templates used for the model building of each protein, as well as the Protein Data Bank (PDB) code and amino acid sequence identities, are presented in

Additional file 4: Table A4. Consensus prediction of transmembrane domains was obtained with TOPCONS [3].

RNA extraction, cDNA synthesis and RT-PCR

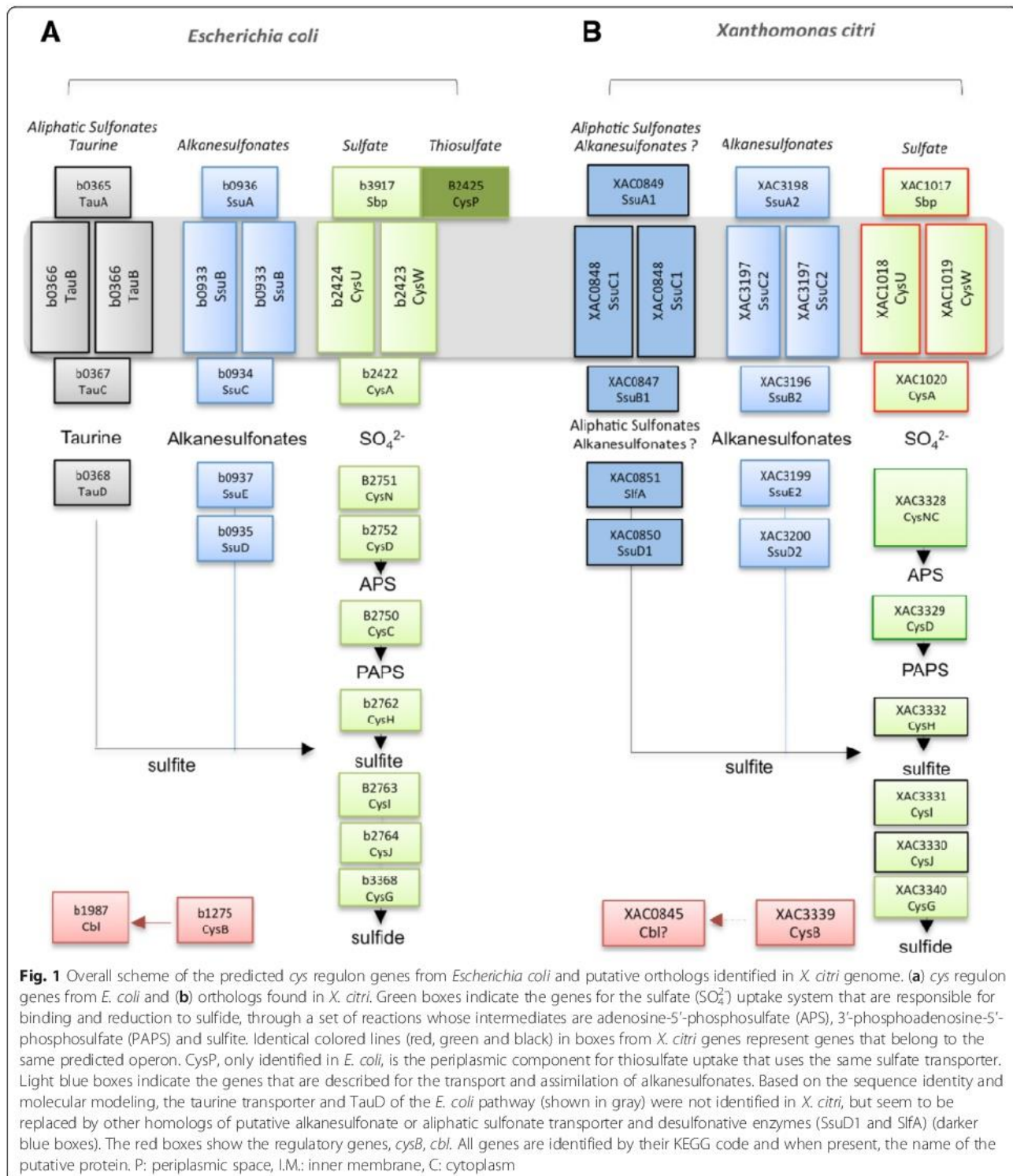
The *X. citri* strain used in this study was grown at 28 °C overnight in Luria-Bertani (LB) modified broth (without NaCl) supplemented with ampicillin (100 µg/ml) at 28 °C at 200 rpm. After the growth period, the cultures were diluted 50 times, washed two times in sterile water and incubated in virulence induction medium to mimic the plant environment, XAM1 [10, 30], or LB until the mid end-exponential growth phase. Samples normalized by O.D. to contain about 10^{14} cells of each culture were transferred to a microcentrifuge tube and centrifuged for 2 min at $14,000 \times g$. We carefully remove the supernatant, leaving the pellet as dry as possible for suspension in 100 µl freshly prepared TE buffer containing lysozyme (10 mg/ml). The mixture was incubated at room temperature for 5 min. The following steps were performed according to the SV Total RNA Isolation System protocol (Promega, Madison, MA, USA). To check that there wasn't DNA contamination we performed PCRs using the RNA samples and no amplifications were detected.

Reverse transcription was carried out on the day after RNA isolation using the GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, MA, USA). A total mix of 50 ng RNA and 0.5 µg Random Primer per reaction was added, and the final volume was brought up to 5 µl with nuclease-free water. The RNA-primer mix was heated at 70 °C for 5 min followed by chilling in ice water for 5 min. Then, the RNA-primer mix was added to the reverse transcription reaction mix. For each cDNA reaction, the reverse transcription reaction mix was composed of the following: 4 µl GoScript™ 5x Reaction Buffer, 2 µl $MgCl_2$, 1 µl PCR Nucleotide Mix, 1 µl GoScript™ Reverse Transcriptase and 7 µl nuclease-free water to a final volume of 15 µl. The RT-PCR temperature sequence was as follows: 25 °C for 5 min to assist annealing, incubation at 42 °C for one hour and incubation at 70 °C for 15 min to inactivate the reverse transcriptase. The cDNA was stored at -20 °C. The PCR was carried out in a 25 µl reaction mixture, using 1 µl of the RT (200 ng template for cDNAs and 100 ng for genomic DNA) reaction as template for 0.5 µl Taq DNA (5U/µl) and 20 pmol of each primer (Additional file 5: Table A5). As positive control of the reactions we used specific oligonucleotides to amplify a 271 bp 16S ribosomal RNA fragment (KEGG number XAC3896). The temperature of annealing for all genes was 51 °C. Amplification was performed in 40 cycles with a T1000 Thermo Cycler (BIO-RAD, Philadelphia, USA).

Results and discussion

X. citri conserves the Cys proteins for sulfate transport and desulfonation to sulfide

E. coli contains at least 27 genes encoding the proteins that belong to the *cys* regulon [14, 37]. The search for orthologs of these genes in the *X. citri* genome revealed that the phytopathogenic bacterium conserves the ABC transporter SbpCysUWA and almost all the enzymes for sulfate to sulfide reduction, as shown in Fig. 1 (green boxes in a and b). All these proteins in *X. citri* are supposedly encoded by the same predicted operon (Fig. 1, red lines in the boxes) and shared high amino acid sequence identity when compared to the *E. coli* orthologs (47 % to 66 %) (Additional file 1: Table A1). *X. citri* Sbp shows conservation of 100 % of the residues that are involved with sulfate binding. According to prediction of transmembrane segments using TOPCONS server [3], the permeases CysU/CysW form a heterodimer that consist of 12 transmembrane spanning helices (6 from each protein). All the proteins putatively involved with sulfate reduction were also identified and conserved in *X. citri*. Two genes, *nodQ* (Xac3328) and *cysD* (Xac3329), encode respectively, a fusion protein that consists of the sulfate adenylyltransferase subunit 1/adenylylsulfate kinase or CysNC, as previously has been identified in other microorganisms such as *Pseudomonas syringae* [17] and *Rhizobium meliloti* [26], and the subunit 2 of the sulfate adenylyltransferase (Additional file 1: Table A1). In *Rhizobium meliloti* the NodQ protein that shares 58 % of amino acid sequence identity with the related protein in *X. citri*, is involved in the synthesis of nodulation factors that are active on the roots of alfalfa as well as in the formation of activated sulfate intermediates, which will be transferred to the nodulation factors by NodH [26, 27]. CysH (Xac3332) in *X. citri* rather works as a PAPS reductase since it exhibits the conserved (KRT)ECG(LS)H signature of the APS/PAPS reductase family, but not the critical four cysteines that coordinate a 4Fe-4S center in APS reductases and it conserves the C239 that is responsible for dimerization in PAPS reductases, according to Kopriva and collaborators [15]. The same operon encodes CysI and CysJ, which exhibit respectively, the conserved domains of ferredoxin-like nitrite/sulfite reductase (PF03460), nitrite and sulfite reductase 4Fe-4S (PF01077), and the cysteines that are responsible for iron-sulfur coordination (Additional file 6: Figure A1-A). Searching for CysG, a syroheme synthase, we found 3 distinct predicted *cysG* genes located in two different positions in the genome (Additional file 7: Figure A2-A). The three proteins shared low sequence identity among them (15-23 %) but the BlastP against the protein data bank resulted in the same three-dimensional structure of the syroheme synthase CysG from *S. typhimurium* (PDB code 1PJQ) [32]. The comparison among the domains of *S. typhimurium*



CysG and the three CysG from *X. citri*, showed that only Xac3340 presented the necessary motifs for the predicted activity (Additional file 7: Figure A2-B). Although Xac3340 encodes an enzyme that fits better in the model of a siroheme synthase, the presence of two other

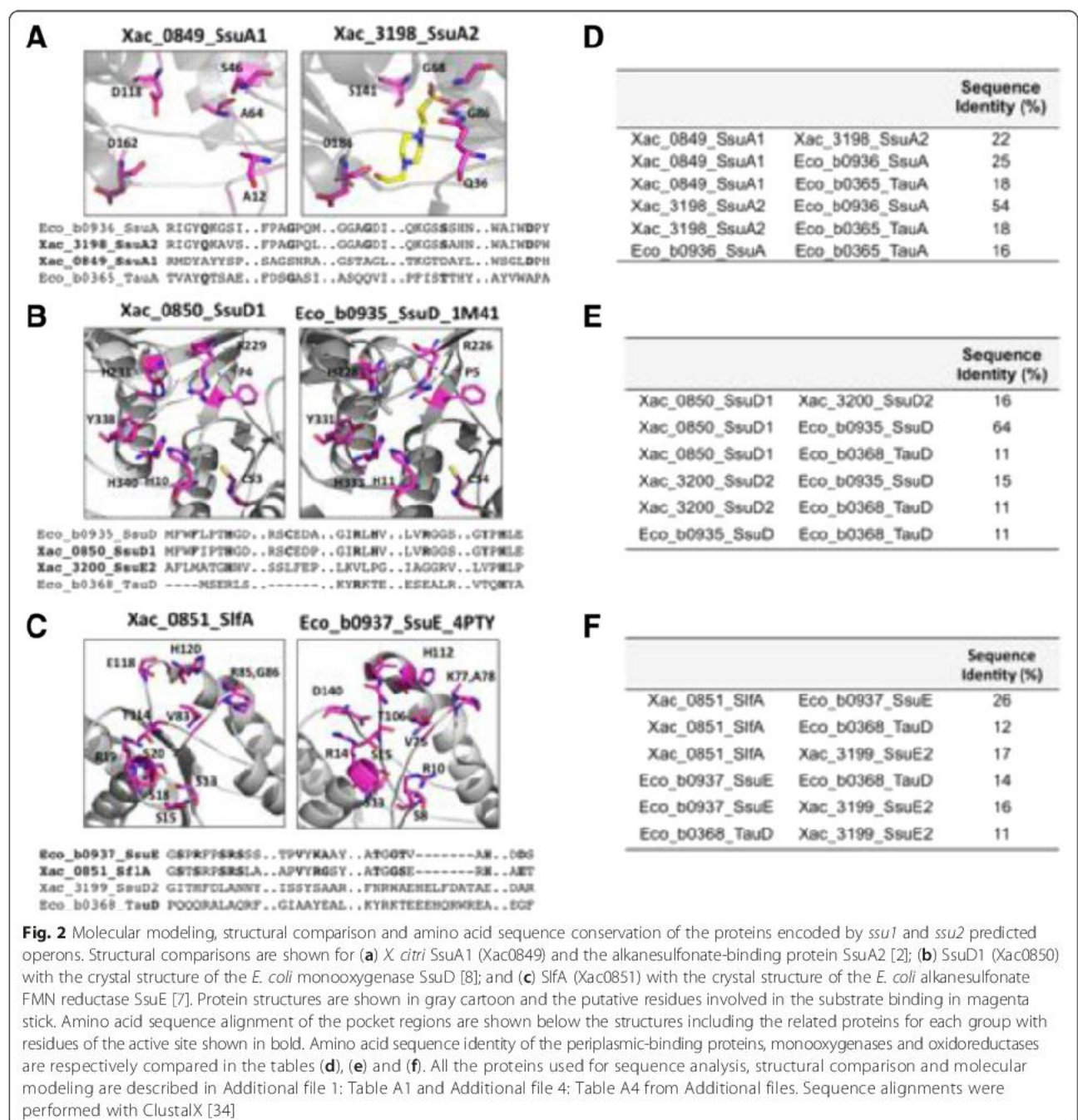
genes with related functions arise the possibility that in *X. citri* the synthesis of siroheme be mediated by more than one enzyme. In fact, the use of three or two enzymes for siroheme synthesis has been described before for *Bacillus megaterium* [22] and *Saccharomyces*

cerevisiae [29], respectively. These data show that the synthesis of syroheme is not clearly defined in *X. citri* and additional functional studies need to be done.

Systems for the transport of alkanesulfonate and aliphatic compounds in *X. citri*

In *E. coli*, during sulfate starvation or depletion, two other operons are induced for the transport and desulfonation of alkanesulfonates and taurine, respectively *ssuABCDE* and *tauABCD* [9, 37, 38]. The organizational

scheme of these transporters is evidenced in Fig. 1a (blue and gray, respectively) and shows that besides the transporter, the predicted operons encode the TauD (*tauABCD* operon) and the two-component system SsuD and SsuE (*ssu* operon) for the desulfonation of the organosulfonates such as taurine and alkanesulfonates, respectively. In contrast, the *X. citri* genome search for these genes resulted in the identification of two distinct predicted operons here denominated *ssu1* (*slfAssuDACB*) and *ssu2* (*ssuDEACB*) (Fig. 1, dark and clear blue, respectively). We previously



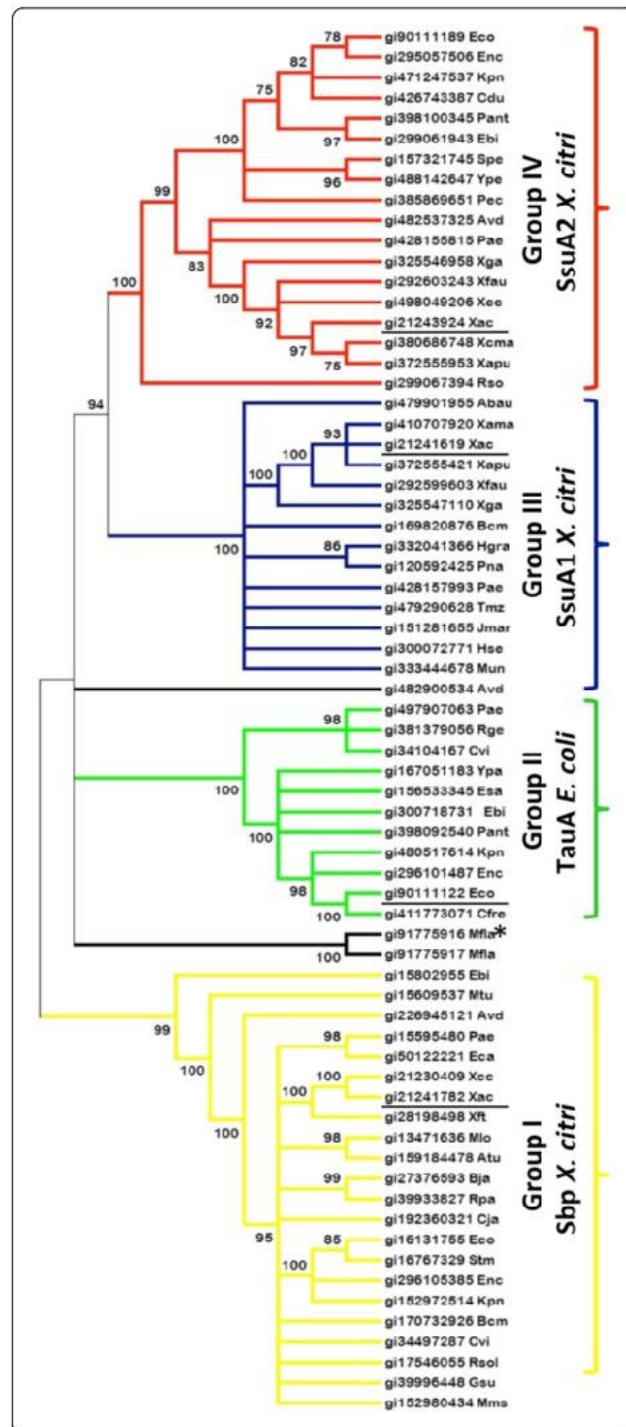


Fig. 3 Phylogenetic analysis of the *X. citri* Sbp, SsuA1 and SsuA2 and their relationship with orthologs identified in different microorganisms. The list of proteins and their reference codes at NCBI are described in Additional file 2: Table A2. Proteins were classified essentially in four groups as the following: Group I (yellow) for sulfate and thiosulfate-binding proteins (Sbp and CysP); Group II (green) for taurine-binding proteins (TauA); Group III (blue) for alkanesulfonate and sulfate ester binding proteins that show higher sequence similarity with the ortholog of *X. citri* SsuA1; and Group IV (red) for alkanesulfonate binding proteins, which best represented by SsuA from *E. coli* and SsuA from *X. citri*. The putative sulfonate-binding protein from *Methylobacillus flagellates* KT, which had its three-dimensional structure solved (PDB code 3UIF), was classified in a separate branch (black lines with asterisk) together with its paralog. The tree was generated with the Neighbor-Joining Method (1000 bootstrap) using the MEGA program version 5 [33]. *X. citri* proteins and *E. coli* TauA were underlined in each group, as a reference

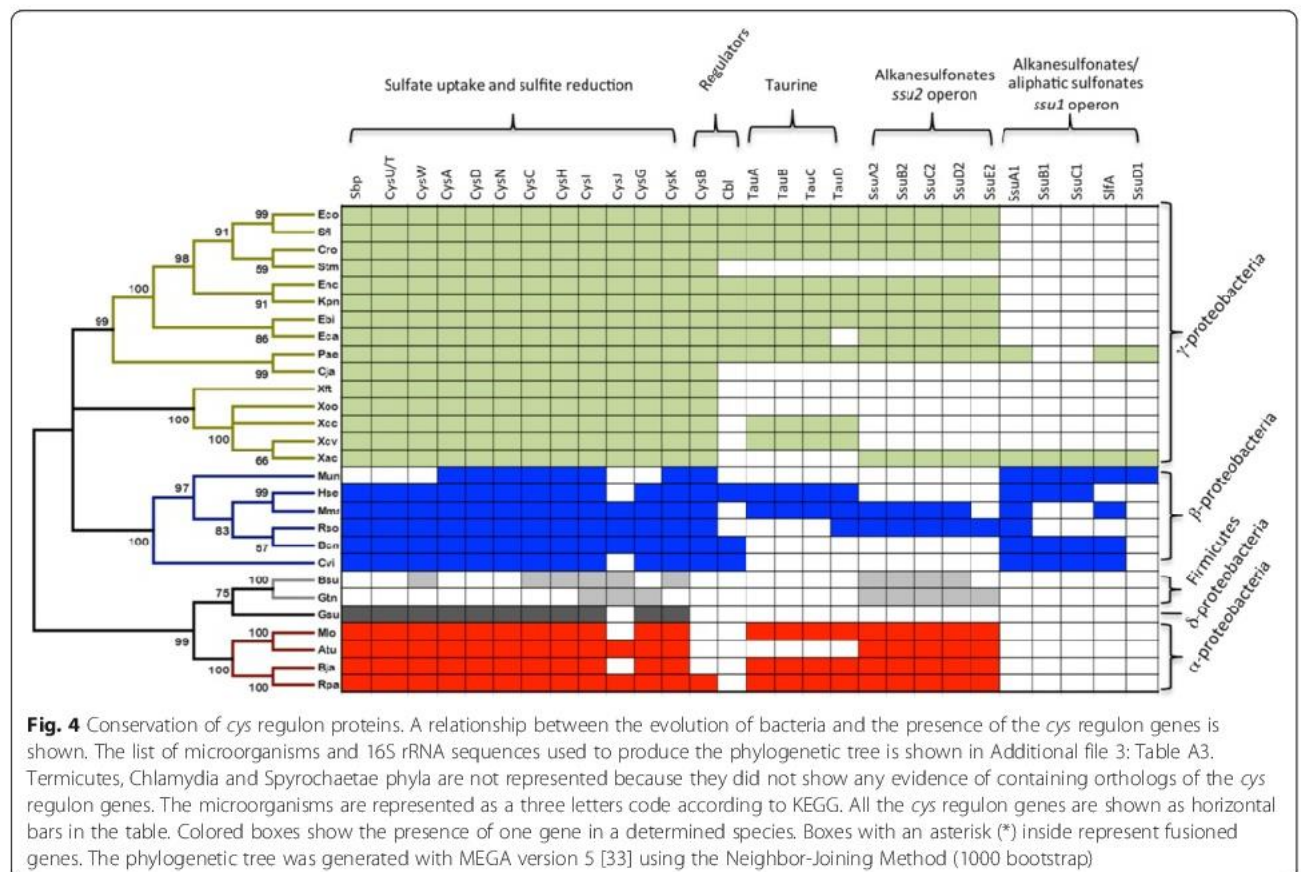
characterized the three-dimensional structure of the *X. citri* SsuA2 (Xac3198) in presence of alkanesulfonates and showed its importance for bacterial growth in minimal media when alkanesulfonates were the unique source of sulfur. Indeed, *Citrus sinensis* leaves infected with the mutant strain demonstrated an attenuated symptom of the canker disease, suggesting a role of this protein in the

infection and pathogenesis mechanisms [2]. A structural comparison and amino acid sequence alignment show that *X. citri* SsuA2 shares 54 % of amino acid sequence identity with *E. coli* SsuA2 and conserves all the residues that interact with the alkanesulfonate (Fig. 2a alignment and d). In addition, the predicted operon *ssu2* also has genes encoding the ABC transporter, SsuC2 (permease) and SsuB2 (ATPase), and the putative two-component system for alkanesulfonate reduction, composed of the nitriloacetate monooxygenase SsuD2 (Xac3200) and the oxidoreductase SsuE2 (Xac3199). However, *X. citri* SsuD2 and SsuE2 do not show amino acid sequence identity with the previous studied orthologues from *E. coli*, or even with the putative proteins encoded by operon *ssu1* (Xac0850 and Xac0851) (Fig. 2e and f, respectively). This fact arises questions about the functionality of these proteins or the two-component system or might show differences in their mechanisms of action. Interestingly, the predicted operon *ssu1* encodes an additional transport system that is distinct from those present in *X. citri* and *E. coli*. To get structural information related to active site, residues for interaction and possible similarities among these proteins and those from Ssu2 system, we modelled SsuA1, SliA and SsuD. SsuA1 model was built based on the structural coordinates from *X. citri* SsuA2 (22 % of amino acid sequence identity) [2] but revealed significant differences in the ligand-binding pocket (Fig. 2a), suggesting that the protein could interact with different range of ligands. Conversely, the structural models of SsuD1 and SliA showed higher sequence identity with the alkanesulfonate monooxygenase SsuD (b0935) [8] (Fig. 2b and e) and the NAD(P)H-dependent FMN reductase SsuE (b0937) [7] from *E. coli* (Fig. 2c and f), orthologues used as templates for the structural models. The data obtained from proteins encoded by the putative *ssu1* operon suggest its role as a second alkanesulfonate transporter system.

Phylogenetic analysis

The previous analyses suggested that *X. citri* had two ABC systems for the transport and assimilation of organosulfur compounds, but it lacks a proper TauABCD system as observed in *E. coli*. In addition, the bioinformatics analysis of the *X. citri* and *E. coli* components based on sequence alignment revealed significant differences among the periplasmic components, suggesting diversity in substrate affinity and specificity. To compare the four different periplasmic-binding proteins, we coupled phylogenetic analysis using a group of orthologs (Fig. 3) and the structural information obtained from molecular modeling. As previously demonstrated [4, 21], Spb proteins (Group I in yellow) form a separate group from the alkanesulfonate and aliphatic sulfonate binding proteins. Interestingly, the other proteins were classified in three different groups: Group II (green) for the orthologs of *E. coli* taurine-binding protein TauA, Group III (blue) for the orthologs of *X. citri* SsuA1 (Xac0849) and Group IV (red) for the orthologs of *X. citri* SsuA2. *X. citri* SsuA1 does not belong to the branch of SsuA2, which represents the alkanesulfonate-binding proteins, or the TauA group for taurine-binding proteins, but it belongs to an intermediary group between both proteins. In fact, these data are endorsed by the significant

differences found in the *X. citri* SsuA1 ligand-binding pocket when compared to SsuA2 and *E. coli* TauA (Fig. 2d). To verify if orthologues of the proteins of *X. citri* involved in the pathways of sulfate and putative organosulfur compounds were conserved during the evolution, we chose microorganisms from distinct classes to build a phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequences (Additional file 3: Table A3). The results show that the system for sulfate uptake and assimilation is highly conserved in the proteobacteria (Fig. 4, colored boxes). The tree suggested a recent evolution of the genes belonging to the alkanesulfonates and organosulfur compounds pathways. Indeed, putative orthologs of the *ssu1* predicted operon are only present in beta-proteobacteria, with exception evidenced for *P. aeruginosa*, which may suggest a possible horizontal gene transfer between this bacterium and *X. citri*. The oldest ancestor found was the *tauA* from *Thermotoga maritima* (tma), a hyperthermophilic bacterium. Ancestral proteins were likely preferably able to bind different compounds than the sulfonates that are transported by the *E. coli* SsuA and TauA proteins, which include the diversity of alkanesulfonates as MOPS, HEPES, ethanesulfonates, propanesulfonates, hexanesulfonates, octanesulfonates and decanesulfonates [9]. The presence of



these genes reveals an adaptation to new and competitive environments. Interestingly, orthologues from the *ssu1* and *ssu2* predicted operons were not found in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and *Xylella fastidiosa* Temecula 1 (Fig. 4). *Xylella*, a xylem-limited bacterium that is insect-vectorized to a variety of hosts [28] presented only the *sbpcysWUA* predicted operon, while in *X. campestris* and *X. vesicatoria*, an evolutionarily older group of *tau* operon has been identified. This predicted operon has an evolutionary divergence from other operons, which gave rise to the putative *ssu* operon (Fig. 4). An interesting feature of this phylogenetic tree is the evidence of the importance of the sulfur uptake systems for *X. citri*, a species that can survive in soils where the availability of sulfate is limited and where most sulfur sources originate from organosulfur compounds [9].

Gene expression of the components from *cys* regulon and predicted *ssu* operons in *X. citri*

To verify if the putative genes involved with sulfate or organic sources of sulfate uptake and assimilation were

expressed during the bacterium growth in two defined conditions, we performed a RT-PCR analysis from samples obtained from rich medium LB modified and virulence inducing medium XAM1, which final sulfate concentration is 7.8 mM [10, 30]. Total RNA samples were extracted from the *X. citri* cells grown in the different culture media and used for cDNA amplification (Fig. 5). The results showed that transcripts from the ABC transporter *sbpcysUWA* were amplified with expected molecular mass from cells cultured in LB modified and XAM1 media (Fig. 5a), indicating that this transport system is expressed in both conditions. In accordance with these results, the periplasmic component Sbp was identified in proteomic analysis of *X. citri* extracts obtained after growth of the cells in LB and the A minimum medium [19]. Curiously, with exception of the *cysH* none of the other genes related to the sulfur pathway were evidenced in LB modified. On the other hand, *cysD*, *cysI* and *cysJ* were observed in XAM1, corroborating previous results based on proteomics analysis from extracts of *X. citri* after growth in XAM1 medium [10]. Since *cysD* and *cysJ* belong to predicted operons that

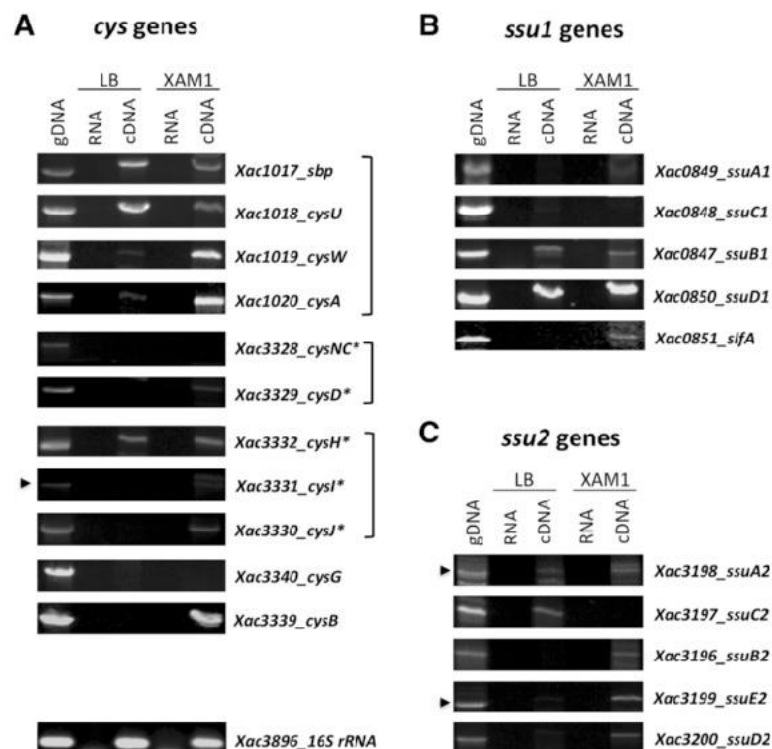


Fig. 5 RT-PCR analysis of the gene expression from the predicted *cys* pathway, *ssu1* and *ssu2* operons of *X. citri*. (a) Genes from the predicted *cys* regulon; (b) genes from predicted operons *ssu1* and (c) *ssu2*. Total RNA was extracted from cells grown in LB and XAM1 media during mid end-exponential growth phase. RT-PCR was carried out as described in the Methods. gDNA: genomic DNA (100 ng); cDNA: complementary DNA (200 ng); RNA: negative control. Genes are described according to the number followed by the correspondent name as shown in KEGG data bank. Proteins encoded by the genes showed with asterisk (*) had the expression identified in the proteomic analysis of *X. citri* extracts obtained after growth in XAM1 medium [10]. Blankets group genes that belong to the same predicted operons. As a positive control a 271 bp fragment of the 16S rRNA is shown. The arrows indicate the expected molecular mass for each transcript

also encode *cysNC* and *cysHI*, respectively, it is possible that the specific conditions used for amplification or amount of transcripts were not suitable for these genes. The gene that encodes the putative CysG (Xac3340) was not identified. Similarly, we tried to amplify the additional *cysG* genes without success. Still in XAM1, we observed the amplification of *cysB* that shares 39 % of amino acid sequence identity with the putative *E. coli* orthologue. In *E. coli*, *cysB* encodes a LysR-type transcriptional activator of the sulfate starvation induced genes needed for activation of the *ssu* and *tau* operons in low levels of sulfate [39]. In accordance with the amplification of *cysB* in XAM1, all *ssu* genes (operons 1 and 2), exception of *ssuC2*, also were amplified from cDNA obtained from this medium (Fig. 5b and c). This result is in accordance with the identification of SsuD2 in extracts of *X. citri* obtained after growing in XAM1 [10], and the demonstration that *X. citri* has the capability to grow in minimum medium M9 when the only source of sulfur was alkanesulfonates [2]. If the regulation of the systems found in *X. citri* is related to that of *E. coli*, the presence of Ssu proteins should be evidenced only in very low levels or absence of sulfate, which would be obtained only after log phasis, explaining the absence of the proteins belonging to the transporter systems and the low level of amplification. Intriguingly, *ssuB1*, *ssuD1*, *ssuA2* and *ssuC2* also were amplified from cDNAs obtained of cells cultivated in LB modified. Since samples were obtained from this and XAM1 media during mid end-exponential growth phase, it is expected that sulfate levels be reduced when compared to the initial of growth and still different between both conditions. A detailed analysis of the physiological conditions that induce the expression of these proteins present in distinct species of the *Xanthomonas* genus is an exciting field that can reveals the importance of sulfur transport systems during the infection and pathogenesis in these bacteria.

Conclusions

In this work, we showed for the first time, that the phytopathogenic bacterium *X. citri* has the ABC transporter for sulfate and two additional systems for the transport and oxidoreduction of alkanesulfonates or organosulfur compounds, respectively, SlfASsuDACB (Ssu1) and SsuDEACB (Ssu2). These systems were differentially induced in LB and XAM1. Comparative and phylogenetic analysis of the periplasmic binding proteins, as well the complete set of genes, showed that SlfASsuDACB differs from the classical taurine transporter and probably was originated from the β -proteobacteria group. The presence of more than one transporter for this kind of compound would give to the *X. citri* the advantageous capability to transport and assimilate distinct sources of sulfur, which is relevant for the bacterium maintenance

and growth. The absence of these transporters in *X. campestris*, which has a different way of infection and pathogenesis, may also reflect the importance of these compounds for the bacterium. Since there is no previous data related to the sulfur assimilation in *X. citri* or *Xanthomonas* genus, the work presented here is an important step for understanding global sulfur metabolism in these bacteria and arises perspectives for further experimental investigations.

Additional files

Additional file 1: Table A1. List of putative orthologues of *cys* regulon genes as described for *Escherichia coli* [10, 15, 38–40] found in the *X. citri* genome. Sequences of the *E. coli* genes were used for BlastN against the *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306 genome. Nucleotide sequence identities were calculated after the pairwise sequence alignment using the EMBOSS Water program (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotide.html).

Additional file 2: Table A2. List of proteins and their hosts used for the phylogenetic analyses of the periplasmic components from *X. citri* belonging to the putatives sulfate and organosulfur compounds pathways.

Additional file 3: Table A3. Microorganisms and access code for the 16S rRNA sequences used to show the conservation of the putatives sulfate and organosulfur compounds pathways proteins in different classes.

Additional file 4: Table A4. Proteins with three-dimensional structure solved used as template for the molecular modeling of the putative sulfur pathway components identified in *X. citri*. Amino acid sequence alignments were performed using ClustalW [35].

Additional file 5: Table A5. Oligonucleotides used for gene amplification in the RT-PCR analysis performed in this study. F: forward and R: reverse oligonucleotides. PCR reactions were described in Methods, using the annealing temperature of 51 °C for all reactions.

Additional file 6: Figure A1. Domain structure of the putative CysI and CysJ of *X. citri*. (A) PFAM domain structure of the putative CysI of *X. citri*. PF03460 = nitrite/sulfite reductase ferredoxin-like half domains and PF01077 = nitrite and sulfite reductase 4Fe-4S binding and siroheme binding. The amino acid sequence (residue numbers 468 to 484) of the PF01077 domain corresponding to the C-terminus of the 4Fe-4S binding and siroheme binding domain is aligned with similar regions of CysI from *Escherichia coli* (KEGG entry: b2763) and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (gi: 15609528). Conserved amino acids are underlined bold. The sequence of the Prosite motif PS00365, [STV]-G-C-x(3)-C-x(6)-[DE]-[L/M/VF]-[GAT]-LIVMF is also shown. (B) PFAM domain structure of the putative CysJ of *X. citri*. PF00258 = flavodoxin domain, PF00667 = FAD binding domain and PF00175 = NAD-binding domain. The amino acid sequence (residue numbers 317 to 442) of the PF00175 domain is aligned with similar regions of CysJ from *Escherichia coli* (KEGG entry: b2764).

Additional file 7: Figure A2. Comparison of the three putative CysG protein sequences found in *X. citri* with the siroheme synthase CysG from *S. typhimurium*. (A) Positioning of the *cysG* genes in the *X. citri* genome. Xac2159 and Xac2157 genes, encoding respectively, an uroporphyrin-III C-methyl transferase and a siroheme synthase, are closely located in opposite directions. The third gene, Xac3341, encoding another siroheme synthase is located in the same predicted operon with the *cysK* gene that encodes a cysteine synthase. (B) Putative conserved domains identified in the three CysG amino acid sequences in comparison with the multifunctional methyltransferase/dehydrogenase/ferredoxinase CysG from *S. typhimurium*, which three-dimensional structure was solved in presence of S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) [1]. The amino acid sequence alignment from the identified domains is shown evidencing the conservation of the residues involved with SAH and NAD interactions (showed in bold).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CTP, AM, and MF performed experiments, analysis and interpretation of data, and also wrote the draft of the manuscript; AB performed analysis and interpretation of the data, revised and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, process number 2013/09172-9), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, process number: 474110/2009-5) and Laboratório Nacional de Biotecnologia (LNBio), CNPq, Brazil. A. M. and C.T.P. received FAPESP fellowships (proc. Number 2010/09812-0 and 2010/14207-8, respectively).

Author details

¹Laboratório de Biologia Estrutural Aplicada, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, Cidade Universitária, São Paulo, SP CEP 05508-000, Brazil. ²Laboratório Nacional de Biotecnologia (LNBio), Centro de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPq), Campinas, SP CEP 13083-970, Brazil.

Received: 28 August 2014 Accepted: 29 June 2015

Published online: 14 July 2015

References

- Aigrain L, Pompon D, Morera S, Truan G. Structure of the open conformation of a functional chimeric NADPH cytochrome P450 reductase. *Embo Rep.* 2009;10:742–7.
- Araújo FT, Bolanos-García VM, Pereira CT, Sanches M, Oshiro EE, Ferreira RC. Structural and physiological analyses of the alkanesulfonate-binding protein (SsuA) of the citrus pathogen *Xanthomonas citri*. *PLoS One.* 2013;8:e80083.
- Bernsel A, Viklund H, Hønnertdal A, Eklöfsson A. TOPCONS consensus prediction of membrane protein topology. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:W465–468.
- Berntsson RP, Smits SH, Schmitt L, Slotboom DJ, Poolman B. A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett.* 2010;584(12):2606–17.
- Cronan GE, Keating DH. A *Sinorhizobium meliloti* sulfotransferase that modifies lipopolysaccharide. *J Bacteriol.* 2002;186:4168–76.
- Da Silva FG, Shen Y, Dardick C, Burdman S, Yadav RC, de Leon AL, et al. Bacterial genes involved in type I secretion and sulfation are required to elicit the rice Xa21-mediated innate immune response. *Mol Plant Microbe Interact.* 2004;17:593–601.
- Driggers CM, Ellis HR, Kar. Crystal structure of *Escherichia coli* SsuE: Defining a general catalytic cycle for FMN reductases of the flavodoxin-like superfamily. *Biochemistry.* 2014; 53: 3509–3519.
- Eichhorn E, Davey CA, Sargent DF, Leisinger T, Richmond TJ. Crystal structure of *Escherichia coli* alkanesulfonate monooxygenase SsuD. *J Mol Biol.* 2002;324:457–68.
- Eichhorn E, van der Ploeg JR, Leisinger T. Deletion analysis of the *Escherichia coli* taurine and alkanesulfonate transport systems. *J Bacteriol.* 2000;182:2687–95.
- Facincani AP, Moreira LM, Soares MR, Ferreira CB, Ferreira RM, Ferro MIT, et al. Comparative proteomic analysis reveals that T3SS, Tfp, and xanthan gum are key factors in initial stages of *Citrus sinensis* infection by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Funct Integr Genomics.* 2014;14:205–17.
- Grundy FJ, Henkin TM. The S box regulon: a new global transcription termination control system for methionine and cysteine biosynthesis genes in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 1998;30:737–49.
- Hayward AC. The hosts of *Xanthomonas*. In: Swings G, Civerolo EL, editors. *Xanthomonas*. London: Chapman and Hall; 1993. p. 1–119.
- Hummerjohann J, Küttel E, Quadroni M, Ragaller J, Leisinger T, Kertesz MA. Regulation of the sulfate starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: role of cysteine biosynthetic intermediates. *Microbiology.* 1998;144:1375–86.
- Kertesz MA. Riding the sulfur cycle-metabolism of sulfonates and sulfate esters in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24:135–75.
- Kopriva S, Büchert T, Fritz G, Suter M, Benda R, Schünemann V, et al. The presence of an iron-sulfur cluster in adenosine 5'-phosphosulfate reductase separates organisms utilizing adenosine 5'-phosphosulfate and phosphoadenosine 5'-phosphosulfate for sulfate assimilation. *J Biol Chem.* 2002;277:9178–91.
- Mougous JD, Green RE, Williams SJ, Brenner SE, Bertozzi CR. Sulfotransferases and sulfatases in mycobacteria. *Chem Biol.* 2002;9:767–76.
- Mougous JD, Lee DH, Hubbard SC, Schelle MW, Vocadlo DJ, Berger JM, et al. Molecular basis for G protein control of the prokaryotic ATP sulfurylase. *Mol Cell.* 2006;21:109–22.
- Nicholas KB, Nicholas Jr HB. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author. 1997. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
- Pegos VR, Nascimento JF, Sobreira TJ, Pauletti BA, Paes-Leme A, Balan A. Phosphate regulated proteins of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: a proteomic approach. *J Proteomics.* 2014;108:78–88.
- Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4:629–36.
- Pilsky S, Paszewski A. Sulfate permeases phylogenetic diversity of sulfate transport. *Acta Biochim Pol.* 2009;56(3):375–84.
- Raux E, Leech HK, Beck R, Schubert HL, Santander PJ, Roessner CA, et al. Identification and functional analysis of enzymes required for precorrin-2 dehydrogenation and metal ion insertion in the biosynthesis of siroheme and cobalamin in *Bacillus megaterium*. *Biochem J.* 2003;370:505–16.
- Rigano LA, Siciliano F, Enrique R, Sendín L, Filippone P, Torres PS, et al. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2007;20:1222–30.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4:406–25.
- Sali A, Blundell TL. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* 1993;234:779–815.
- Schwedock JS, Liu C, Leyh TS, Long SR. *Rhizobium meliloti* NodP and NodQ form a multifunctional sulfate-activating complex requiring GTP for activity. *J Bacteriol.* 1994;176:7055–64.
- Schwedock JS, Long SR. *Rhizobium meliloti* genes involved in sulfate activation: the two copies and a new locus, *saa*. *Genetics.* 1992;132:899–909.
- Simpson AJ, Reinach FC, Arruda P, Abreu FA, Acencio M, Alvarenga R, et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* consortium of the organization for nucleotide sequencing and analysis. *Nature.* 2000;406:151–9.
- Smith KJ, Stroupe ME. Mutational analysis of sulfite reductase hemoprotein reveals the mechanism for coordinated electron and proton transfer. *Biochemistry.* 2012;51:9857–68.
- Soares-Costa A, Silveira RS, Novo MTM, Alves MFM, Carmona AK, Belasque Jr J, et al. Recombinant expression and characterization of a cysteine peptidase from *Xanthomonas citri* pv. *citri*. *Genet Mol Res.* 2012;11:4043–57.
- Stec E, Witkowska-Zimny M, Hryniewicz MM, Neumann P, Wilkinson AJ, Brzozowski AM, et al. Structural basis of the sulphate starvation response in *E. coli*: crystal structure and mutational analysis of the cofactor-binding domain of the Cbl transcriptional regulator. *J Mol Biol.* 2006;364:309–22.
- Stroupe ME, Leech HK, Daniels DS, Warren MJ, Getzoff ED. CysG structure reveals tetrapyrrole-binding features and novel regulation of siroheme biosynthesis. *Nat Struct Biol.* 2003;10:1064–73.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28:2731–9.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:4876–82.
- Turnbull AL, Surette MG. Cysteine biosynthesis, oxidative stress and antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol.* 2010;161:643–50.
- Valdés J, Veloso F, Jedlicki E, Holmes D. Metabolic reconstruction of sulfur assimilation in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* based on genome analysis. *BMC Genomics.* 2003;4:1–16.
- Van der Ploeg JR, Eichhorn E, Leisinger T. Sulfonate-sulfur metabolism and its regulation in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol.* 2001;176:1–8.
- Van Der Ploeg JR, Iwanicka-Nowicka R, Bykowski T, Hryniewicz MM, Leisinger T. The *Escherichia coli* *ssuEADCB* gene cluster is required for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates and is regulated by the transcriptional activator Cbl. *J Biol Chem.* 1999;274:29358–65.

39. Van der Ploeg JR, Iwanicka-Nowicka R, Kertesz MA, Leisinger T, Hryniewicz MM. Involvement of CysB and Cbl regulatory proteins in expression of the *tauABCD* operon and other sulfate starvation-inducible genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1997;179:7671–8.
40. Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Menck CF, Da Silva AC, Ferro JA, et al. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 2002;40:169–89.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ANEXO 02- Sulfate-Binding Protein (Sbp) from *Xanthomonas citri*: Structure and Functional Insights.

Sulfate-Binding Protein (Sbp) from *Xanthomonas citri*: Structure and Functional Insights

Cristiane Tambascia Pereira,^{1,2,3} Cássia Roesler,^{1,2} Jéssica Nascimento Faria,^{1,2}
Melissa Regina Fessel,¹ and Andrea Balan³

¹Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, São Paulo, Brazil; ²Universidade de Campinas–UNICAMP, Instituto de Biologia, Campinas São Paulo, Brazil; and ³Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas II, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Accepted 12 April 2017.

The uptake and transport of sulfate in bacteria is mediated by an ATP-binding cassette transporter (ABC transporter) encoded by *sbpcysUWA* genes, whose importance has been widely demonstrated due to their relevance in cysteine synthesis and bacterial growth. In *Xanthomonas citri*, the causative agent of canker disease, the expression of components from this ABC transporter and others related to uptake of organic sulfur sources has been shown during in vitro growth cultures. In this work, based on gene reporter and proteomics analyses, we showed the activation of the promoter that controls the *sbpcysUWA* operon in vitro and in vivo and the expression of sulfate-binding protein (Sbp), a periplasmic-binding protein, indicating that this protein plays an important function during growth and that the transport system is active during *Citrus sinensis* infection. To characterize Sbp, we solved its three-dimensional structure bound to sulfate at 1.14 Å resolution and performed biochemical and functional characterization. The results revealed that Sbp interacts with sulfate without structural changes, but the interaction induces a significant increasing of protein thermal stability. Altogether, the results presented in this study show the evidence of the functionality of the ABC transporter for sulfate in *X. citri* and its relevance during infection.

Sulfur is an ubiquitous element of the Earth that can be obtained from a variety of molecules from which sulfate is the preferred source (Aguilar-Barajas et al. 2011). In bacteria, there are different mechanisms for sulfate or organic sulfonate uptake, which involve the transport of these molecules through the inner membrane (Sekowska et al. 2000). ATP-binding cassette (ABC) transporters represent one of the biggest families of membrane proteins responsible for the transport of different molecules, including lipids, oligopeptides, sugars, amino acids, and ions. Due to the diversity of transported substrates, they are extensively reported as important for the mechanisms of virulence and pathogenesis in many species (Brown et al. 2001; Kemner et al. 1997; Li and Wang 2011; Murphy et al. 2016). One known active system for transport of sulfate is the ABC transporter SbpCysUWA, composed of a periplasmic sulfate-binding protein, Sbp, responsible for ion uptake, two permeases CysU and CysW (heterodimer) that form a pore for substrate

passage, and the ATPase CysA (homodimer) that gives energy to the process (Scheffel et al. 2005). The importance of this transporter has been directly associated to cysteine and methionine synthesis, but its absence causes generalized deficiency in growth, infection, and virulence of many bacteria (Kertesz 2001; van der Ploeg et al. 1999). Sbp, responsible for affinity and specificity of the transport, is essential for the first steps of sulfate assimilation. Due to its location in the periplasm, it has been used as antigen vaccines in bacteria (Garmory and Titball 2004; Otsuka et al. 2014) and strategic target for the development of growth inhibitors in *Mycobacterium tuberculosis* (Bhave et al. 2007; Paritala and Carroll 2013). In the *Xanthomonas* genus, the lack of sulfur-containing amino acids, sulfur compounds, or sulfate have been associated with the induction-of-pathogenicity locus in the citrus hosts and in vitro (Schulte and Bonas 1992), production of xanthan gum in *Xanthomonas campestris* (García-Ochoa et al. 2000), expansion of lesions caused by *X. phaseoli* in soybean (Laurence and Aluisio 1981), and attenuation of canker symptoms (Li and Wang 2011; Tófoli de Araújo et al. 2013). In *X. citri*, sulfur is also required for enzymes such as SufE (XAC2355), which is involved in iron-sulfur cluster biosynthesis under iron-limitation and stress conditions (Guzzo et al. 2006).

A search in the *X. citri* genome has shown more than 30 genes involved with sulfur metabolism, including most of the genes belonging to the *cys* regulon, such as cysteine pathway and sulfur-compounds uptake and assimilation genes (Pereira et al. 2015). The conservation is mainly evidenced in orthologs from *X. campestris* pv. *campestris* and the phytopathogenic bacterium *Xyllela fastidiosa* (up to 95% of amino acid sequence identity), both with quite different ways of infection and pathogenesis development (Brunings and Gabriel 2003). *X. citri* Sbp also shows 60% amino acid sequence identity with the sulfur limitation-induced solute-binding protein ABC-T SMb21133 from the soil bacterium *Rhizobium leguminosarum* Rlv3841 (Mauchline et al. 2006). ABC-T SMb21133 and other transporters of sulfate and molybdate have been related to nitrogen fixation in *R. leguminosarum* (Cheng et al. 2016).

Previous polymerase chain reaction (PCR) analysis of cDNA obtained from *X. citri* showed that all the components from the *X. citri* sulfate ABC transporter are transcribed during bacterial in vitro growth (Pereira et al. 2015). Sbp has been identified by mass spectrometry analyses in different conditions (Mehta and Rosato 2001; Pegos et al. 2014; Soares et al. 2010), and the *sbp* mutant of *X. citri* showed attenuated symptoms of canker development in citrus plants, indicating the protein is important during infection and pathogenesis (Li and Wang 2011).

In this work, we focused on the functional and structural characterization of periplasmic-binding protein Sbp, unveiling

Corresponding author: A. Balan; Telephone +5511 3091-7745;
E-mail: abalan@usp.br

its mechanism of sulfate binding and important residues for the ion interaction. Furthermore, based on a gene reporter, we demonstrated that the promoter that regulates operon *sbpcysUWA* expression is highly activated during bacterial growth in vitro and during infection in vivo in *Citrus sinensis*, even after 8 days of inoculation, evidencing the relevance of Sbp for sulfur assimilation and its cognate ABC transporter.

RESULTS AND DISCUSSION

Activation of the p1017 promoter during growth of *X. citri* cells in vitro and in vivo.

The operon *sbpcysUWA*, encoding for genes XAC1017 to XAC1020, was previously described in *X. citri* and corresponds

to a sulfate ABC transporter, which was shown to be very conserved in the *Xanthomonas* genus and in other bacteria (Pereira et al. 2015). Upstream of the first gene of the operon, XAC1017 (*sbp*), we found an intergenic region in which the operon promoter, herein, named p1017 (Fig. 1A) is located. To analyze in what conditions the p1017 promoter was induced in *X. citri*, cells were transformed with the pKX33 vector containing the reporter gene *EGFP* (enhanced green fluorescent protein) under control of the p1017 promoter (pKX33.p1017EGFP). The activation of the promoter was analyzed during growth of the *X. citri* cells in Luria Bertani (LB) broth medium for 24 h and in vivo, after inoculation of transformed cells into *C. sinensis* leaves during 14 days of bacterial infection (Fig. 1B and C). The activation of the p1017 promoter in

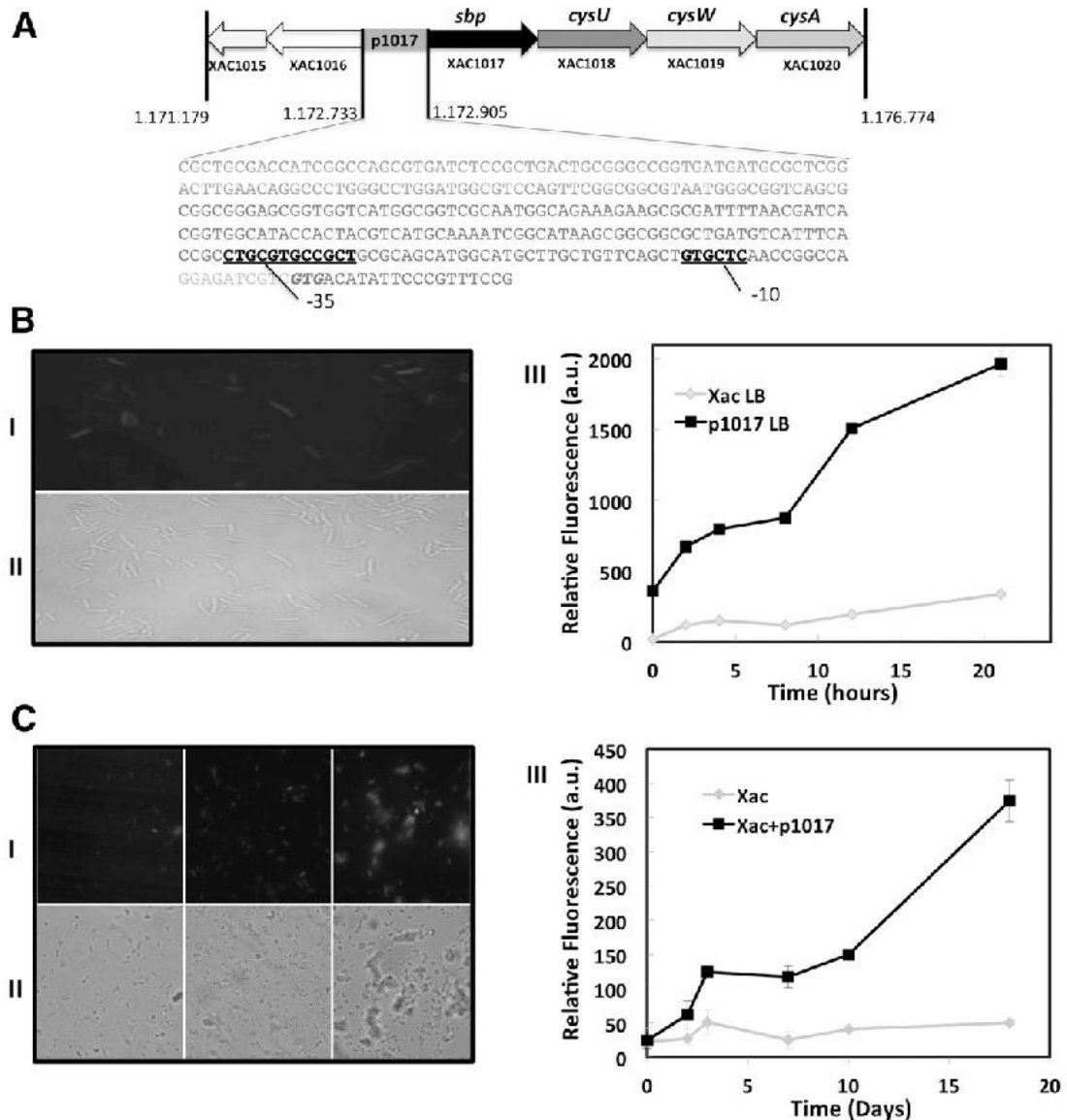


Fig. 1. Transcriptional activation of the promoter of the *sbpcysUWA* operon in *Xanthomonas citri*. **A**, Genome organization of *X. citri* genes from the putative sulfate ABC transporter. *Sbp* encodes the periplasmic sulfate-binding protein; *cysU* and *cysW* encode the permeases of the transporter forming a heterodimer and *cysA* encodes the homodimer of ATPases. Numbers represent the genome position. The intergenic region p1017 is shown evidencing the predicted promoter -10 and -35 sequences. Data and annotation were obtained from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database. **B**, Fluorescence micrography of an overnight culture of *X. citri* in Luria Bertani (LB) broth medium carrying the plasmid pKX33.p1017.EGFP, which sets the gene reporter under the control of p1017 promoter. Panel II, Bacteria seen under white light. Panel III, Time-course analysis of the relative fluorescence (absolute fluorescence normalized by absorbance of the culture) of *X. citri*+pKX33.p1017.EGFP and wild *X. citri* grown in liquid LB broth. **C**, Panel I, Fluorescence micrography of *X. citri* carrying the plasmid pKX33.p1017.EGFP, extracted from infected citrus leaves after 7 or 10 days or 2 weeks from infection. Panel II, Bacteria seen under white light. Panel III, Time-course analysis of the relative fluorescence (absolute fluorescence normalized by total protein content) of *X. citri*+pKX33.p1017.EGFP and wild *X. citri* extracted from infected citrus leaves.

LB broth cultures was first evidenced by fluorescence microscopy of an overnight culture of *X. citri* carrying plasmid pKX33.p1017EGFP grown in LB broth medium, which showed cells with green fluorescence due to EGFP expression in contrast with the control samples. These data were further corroborated by evaluation of the relative fluorescence in a time-course analysis of *X. citri* carrying pKX33.p1017EGFP in comparison with wild *X. citri* (Fig. 1B). The fluorescence is observed after just 2 h of cellular growth, with a significant increase after 8 h of cultivation, which corresponds to the log phase. In addition, the measurement of EGFP fluorescence during the infection of *C. sinensis* leaves also revealed p1017 promoter induction already in the early stages of infection (3 days), with an apparent increase after 10 days of infection (Fig. 1C). These results show that activation of the promoter is associated with bacterial growth in vitro and in vivo, evidencing the relevance of sulfur for maintenance inside the plant and corroborating the importance of this transporter for the bacterium. Moreover, results show that after the first induction, the promoter is kept activated, confirming sulfate levels or availability of the ion are low in the plant.

Evidences of Sbp expression in different culture media.

To evaluate the effect of culture medium in Sbp expression, *X. citri* cells were cultivated in rich medium LB broth, minimum medium M9, and M9 with a half concentration of sulfate (M9.1/2) and were submitted to mass spectroscopy analysis. Cells were grown for 72 h, when total cellular protein extracts were obtained and were applied in a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), for further proteomics analyses (range of 35 to 45 kDa) (Fig. 2A and B). The effect of the sulfate concentration on *X. citri* Sbp was analyzed using as reference the results obtained in the medium

containing the lower ion concentration, which was M9.1/2 (1 mM sulfate). Statistics analysis was performed applying the *t* test. Sbp was considered up- or down-regulated by sulfate when expression levels were increased more than 1.5-fold or decreased more than 0.67-fold, respectively, according to Blavillain and collaborators (2007) (Fig. 2C). The data showed that, when *X. citri* is grown in medium containing restricted amounts of sulfate, Sbp levels are increased and sulfate-dependent when compared with the rich medium. In LB broth, the presence of Sbp is reduced, probably due to the high concentration of other sources of sulfur, such as cysteine and methionine, which are described as inhibitors of the system in other bacteria (Eichhorn et al. 2000; Kertesz 2000). These data are in accordance with the lower levels of EGFP relative fluorescence observed in plants in which sulfate availability is very low (Cook et al. 1998; Sekowska et al. 2000) and most of the available sulfur comes from organic sulfonates, cysteine, and methionine and their oxidation products (Kocsis et al. 1998). In fact, organic sulfonates must constitute the major source of sulfur in the plant once *X. citri* has at least two other ABC transporters dedicated to organic sulfur uptake, the expression of which was evidenced in conditions that simulate the plant (Pereira et al. 2015). Interestingly, Sbp also has been identified by mass spectrometry analysis of enriched protein extracts from *X. citri* grown in nutrient broth NB (Soares et al. 2010), medium containing controlled concentrations of phosphate (Pegos et al. 2014), and in the leaf extracts of a susceptible host plant (*Citrus sinensis* or sweet orange) (Mehta and Rosato 2001). These data show that, even at a high or low concentration of sulfate, the protein is present, suggesting that its regulation is not so tight. In fact, the regulation of the systems

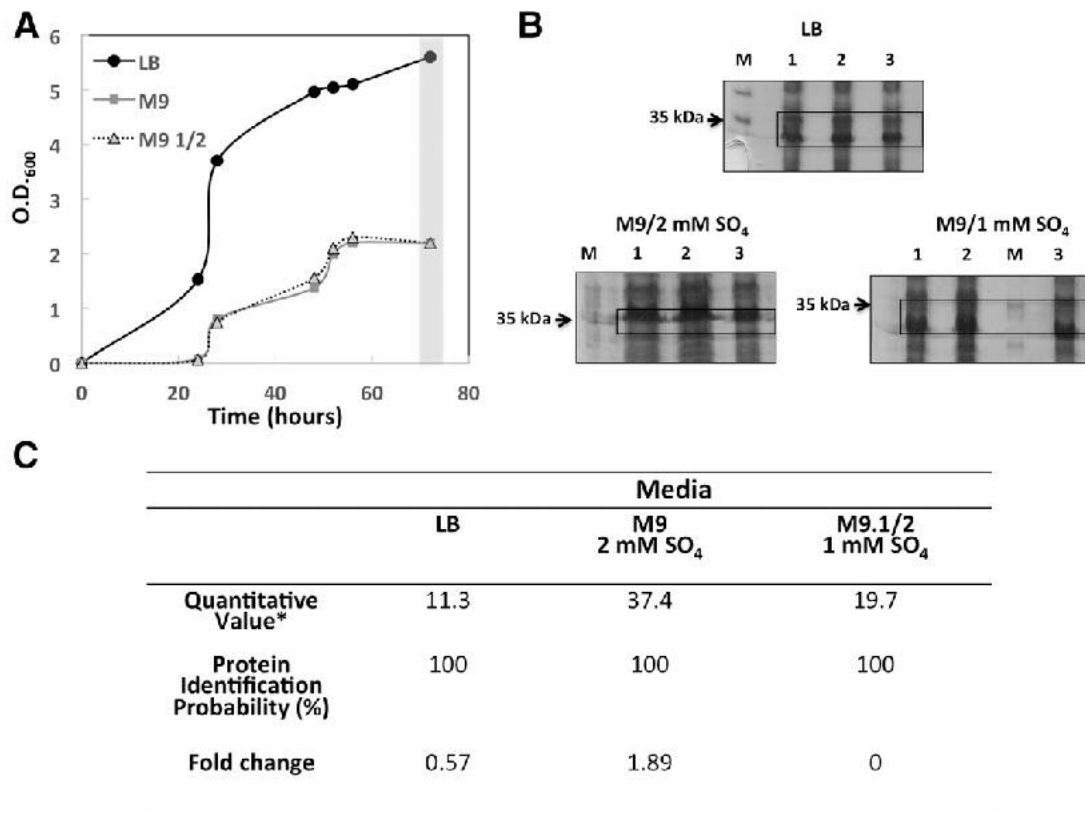


Fig. 2. The presence of sulfate-binding protein (Sbp) in *Xanthomonas citri* extracts after proteomics analysis. **A**, Growth curves of *X. citri* in Luria Bertani broth, M9 minimum medium (2 mM ammonium sulfate), and M9.1/2 minimum medium (1 mM ammonium sulfate). Samples for analyses were obtained from the 72-h culture (gray bar). **B**, Analysis of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of the three normalized extracts that were used for proteomics analysis. Black boxes show the gel region that was cut and submitted to trypsin digestion. **C**, Values obtained ($P < 0.05$) in the analysis when M9.1/2 was used as a reference.

involved with sulfur assimilation in *X. citri* is still unclear. In *Escherichia coli*, two transcriptional regulators are involved with the expression of transport systems dedicated to sulfate and organic sulfur sources CysB and Cbl (van der Ploeg et al. 1997). CysB is the transcriptional activator of the sulfate system, while Cbl is responsible for expression of *ssu* genes (sulfate starvation systems) in the absence of sulfate (Stec et al. 2006). A putative ortholog of CysB was identified in *X. citri* genome (XAC3339) but none for Cbl (Pereira et al. 2015), suggesting differences in the control of these proteins in *X. citri*. There is evidence that, in *X. citri*, the expression of components of the additional ABC transporters dedicated to organic sulfur uptake (alkanesulfonates) operates in conjunction with the expression of the SbpCysUWA components (Pereira et al. 2015). The study of the role of putative regulator CysB would be of interest for the understanding of sulfur regulation in *X. citri*.

***X. citri* recombinant Sbp is expressed as a soluble, stable, and monodisperse protein.**

Once we showed that Sbp was relevant for *X. citri* during different conditions of infection, we focused on the functional and structural characterization of this protein as a player for the sulfate uptake. After cloning and confirmation that the correct construct was obtained (Fig. 3A), the recombinant Sbp protein

was expressed and purified in the *E. coli* BL21 (DE3) strain as a soluble cytosolic protein genetically fused at the N-terminal end with a His₆ tag encoded by the pET28a expression vector. Maximum soluble protein yields, representing up to 70% of the total expressed protein, were achieved after 4 h of cultivation in LB broth medium, at 37°C, with aeration. The recombinant protein with a calculated molecular mass of 37.5 kDa was first purified by affinity chromatography after elution with different concentrations of imidazole (Fig. 3B). To eliminate small contaminants and aggregates, the purified samples were submitted to size-exclusion chromatography and were purified as a single peak (Fig. 3C). Approximately 65% of the recombinant protein was recovered at the end of the purification process and the protein remained soluble and stable at high concentrations (20 mg/ml). Dynamic light scattering (DLS) analysis revealed that Sbp was obtained as a monomer and monodisperses, allowing its use for the following experiments (Fig. 3D).

Sbp shows increased thermal stability in the presence of sulfate.

The far-UV circular dichroism (CD) spectra of *X. citri* Sbp were recorded in the absence and the presence of the oxyanions sulfate and molybdate, as a negative control (Fig. 4A). The

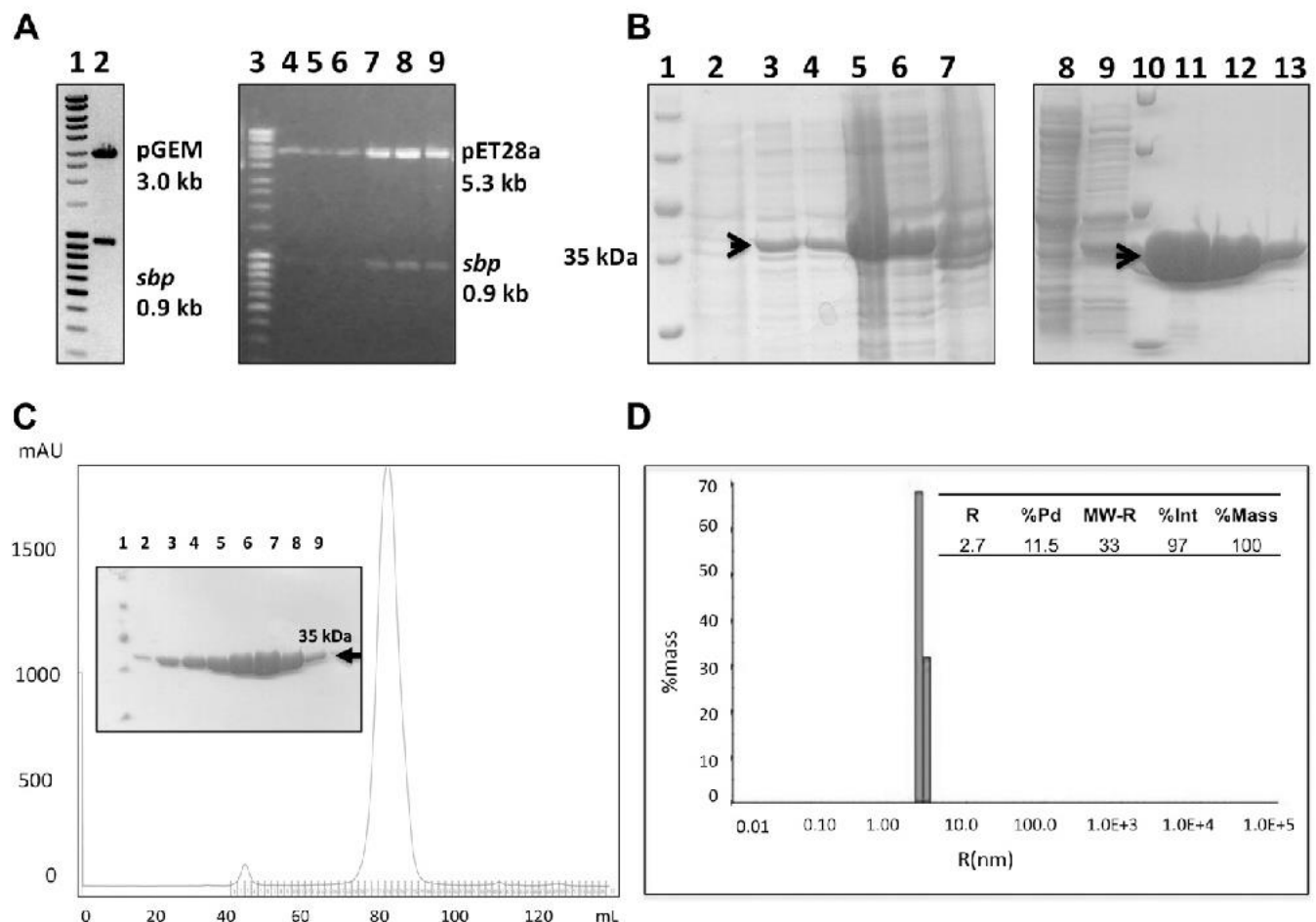


Fig. 3. Production of the pure recombinant *Xanthomonas citri* sulfate-binding protein (Sbp). **A**, Cloning steps of the 0.9-kb fragment corresponding to the *Sbp* gene in pGEM and pET28a vectors. Lane 1, molecular weight; lane 2, cleavage of pGEMsbp with *Nde*I and *Hind*III liberating the vector and gene fragments; lane 3, molecular weight; lanes 4 to 9, cleavage of different vectors pET28aSbp with *Nde*I and *Hind*III liberating the vector and gene fragments. **B**, Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the expression and immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) purification of Sbp from *Escherichia coli* cells. Lanes 1 and 10, molecular weight marker; lane 2, extracts of noninduced bacterial culture; lanes 3 and 4, extracts of 2-h and 4-h, respectively, induced bacterial culture with isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; lanes 5 and 6, soluble fractions I and II, respectively; lane 7, insoluble fraction; lanes 8 and 9, flowthrough from IMAC chromatography; lanes 10 to 13, eluted fractions from chromatography, using buffers with 50, 100, and 150 mM imidazole, respectively. **C**, SDS-PAGE of the fractions from the size-exclusion chromatograph of Sbp after the IMAC purification. Lane 1, molecular weight markers, lanes 2 to 9, eluted fractions from the single peak obtained in the purification. **D**, Dynamic light scattering analysis of the purified recombinant Sbp revealing the monomeric and monodisperse state of the protein.

analysis of Sbp spectrum revealed that the protein is well-structured in solution, as it presents a relative maximum peak at 198 nm and two relative minima peaks at 208 and 222 nm, corresponding to an alpha-beta protein, as previously evidenced in the three-dimensional structure. No significant changes in the secondary structure content of the protein were observed on the addition of either sulfate or molybdate ions at a molar ratio of 1:10. On the other hand, as previously reported (Hamorsky et al. 2012), when Sbp was monitored by near-UV (250 to 320 nm) analysis, which is very sensitive to small changes in the tertiary structure, the addition of sulfate ions was able to induce changes in the protein spectrum, suggesting that structural changes, indeed, occur upon sulfate binding and, possibly, are located in the flexible regions of the protein (Fig. 4B). This effect is specific to sulfate ions, since the addition of molybdate did not induce major alterations on SBP near-UV spectrum (Fig. 4B). To further investigate the effect of sulfate binding on Sbp, we analyzed the thermal stability of the protein in the absence and the presence of ions. By evaluating the Sbp CD signal at 222 nm, as a function of temperature, in the presence or absence of oxyanions, we observed a remarkable increase of 15°C in the midpoint temperature (T_m) (55°C to 70°C) in the presence of sodium sulfate but not of molybdate (Fig. 4C), probably due to the additional hydrogen bonds that occur for sulfate binding. These data corroborate the fact that crystals of *X. citri* Sbp only were obtained in the presence of sulfate, possibly because the bound protein assumes a more stable conformation.

The three-dimensional structure of Sbp showed a highly conserved ligand-binding site with a sulfate ion inside.

Crystals of *X. citri* Sbp usually showed growth after 6 days leading to a rod shape with dimensions of 50 × 500 μm. Crystals were obtained in six different crystallization conditions containing polyethylene glycol (PEG), morpholineethanesulfonic acid (MES), or *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) in a pH range of 6.5 to 7.5, but only in the presence of sulfate. None of these crystals, however, were capable of generating diffraction patterns with resolution better than 7 Å. Crystals were grown in 0.2 M potassium sulfate, 20% PEG3350 and were diffracted at 1.14 Å resolution (Fig. 5A). After processing, crystals showed the symmetry and systematic absences of the space group C_{121} . Table 1 summarizes the data collection

statistics. The Matthews coefficient (Matthews 1968) was calculated to be 2.41 Å³/Da and the solvent content 49%, corresponding to one molecule in the asymmetric unit (Fig. 5B). The crystal structure of *X. citri* Sbp was solved by the molecular replacement method, using a 1.7 Å structural coordinate from *Salmonella typhimurium* Sbp for the initial phasing (Protein Data Base [PDB] code 1SBP). The final model consists of residues 25 to 338, which corresponds to the mature protein without the signal peptide. The first Sbp structure of a phytopathogenic bacterium revealed the same three-dimensional organization described for its ortholog. The cleft, where sulfate is bound, is delimited by N and C domains, each one encompassing two noncontiguous sequences forming a β-sheet structure surrounded by α-helices (Fig. 5C). At the N domain, residues 25 to 120 and 246 to 308 are organized in a four-stranded parallel and antiparallel β-sheet set surrounded by eight α-helices. Similarly, the C domain is also characterized by a four-stranded antiparallel β-sheet flanked by seven α-helices, defined by residues 121 to 245 and 309 to 338. The interconnection of the lobes involves two loops (121 to 123 and 24 to 245 residues) that lay at the opposite side of the cleft entrance. As in the *S. typhimurium* ortholog, the sulfate binding in *X. citri* Sbp is mediated by five conserved residues that perform seven hydrogen bonds and van der Waals' forces with the oxyanion (Fig. 5D). There are no water molecules inside the pocket after ligand interaction.

According to the three-dimensional structure of *X. citri* Sbp, at least two tryptophans, W¹⁶¹ and W²¹⁸, could be highly affected after sulfate binding, most probably W²¹⁸, which is located inside the ligand-binding pocket and directly interacting with the ion through a hydrogen bond (Fig. 6A). W²¹⁸ is located at the end of β-strand 6, making a basement for the ligand-binding site. In order to investigate this possibility, we evaluated the intrinsic fluorescence of SBP tryptophans, in the absence or in the presence of the oxyanions sulfate or molybdate (Fig. 6B). Sbp has seven tryptophan residues, but its emitted fluorescence spectrum, with excitation at 295 nm, revealed a single broad band, with λ_{max} at 327 nm (Fig. 6B), suggesting that the majority of the W residues are found in an apolar environment. The addition of sulfate ions did not alter the λ_{max} of Sbp emission; however, a clear suppression of the fluorescence in function of the increase on sulfate (but not on molybdate) concentration was observed (Fig. 6B), evidencing

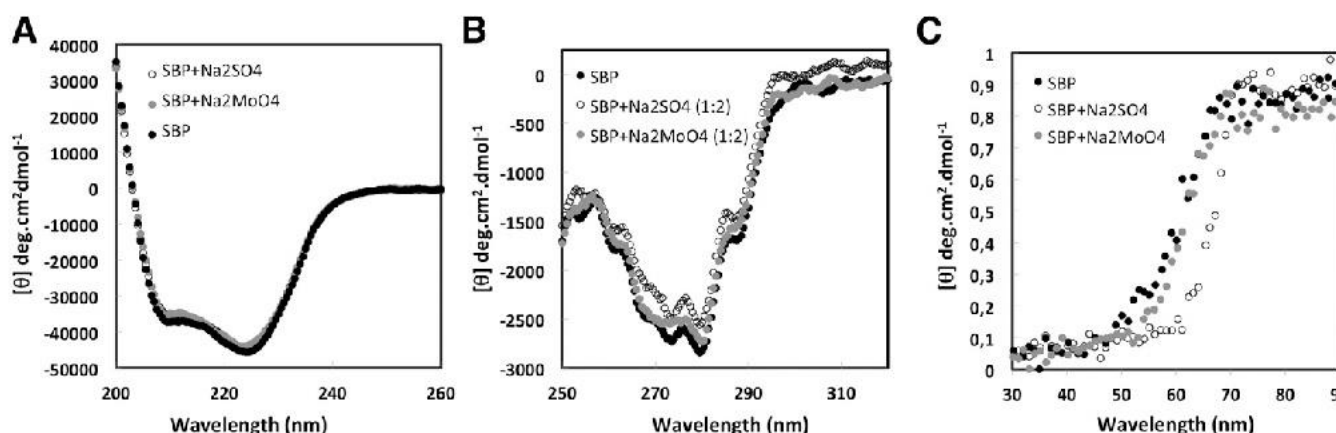


Fig. 4. Spectroscopic characterization of sulfate-binding protein (Sbp) in the absence and in the presence of oxyanions. **A**, The far UV circular dichroism spectrum of 5 μM SBP is characteristic of an α/β folded protein. No significant differences were observed when 5 μM Sbp was treated with 10 μM of either SO₄²⁻ or MoO₄²⁻. **B**, Comparison of near circular dichroism near UV spectra of 18 μM Sbp in the presence and absence of 36 μM SO₄²⁻ suggests that SO₄²⁻ binding on Sbp induces changes in the tertiary structure of the protein. Sbp treated with MoO₄²⁻ was tested as a negative control. **C**, Thermal denaturation of 5 μM Sbp in the absence (midpoint temperature [T_m] = 55°C) or presence of 10 μM of either SO₄²⁻ (T_m = 65°C) or MoO₄²⁻ (T_m = 55°C) was analyzed by monitoring the molar ellipticity measured at 222 nm as a function of the temperature, and the protein unfolded fraction was determined. The binding of SO₄²⁻ but not of MoO₄²⁻ promotes a significant (10°C) increase on thermal stability of the protein.

a quenching phenomenon. Based on the fluorescence intensity data of Sbp titrated with sulfate and applying equation I (provided below), we calculated the Sbp binding constant (K_b) and the number of binding sites (n). The binding parameters of SO_4^{2-} were described as $n_{\text{sulfate-SBP}} = 0.82$ and the $K_b = 0.68 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Fig. 6C), which indicates a $K_d = 1.45 \text{ }\mu\text{M}$.

As previously demonstrated (Dudev and Lim 2004), the specificity of Sbp for sulfate but not molybdate is explained by a set of features such as the interactions with solvent and residues and, also, the pocket size. Once the three-dimensional structure of *X. citri* ModA (Balan et al. 2008) (PDB code 2H5Y) was solved in the presence of molybdate, we compared the structures, focusing on the ligand-binding pocket, and observed that both proteins conserved secondary structures with significant differences at the C terminal, which is much longer in the sulfate-binding protein than ModA (Fig. 7A and B, panel I, in yellow), and that the ligand-binding pocket in Sbp is smaller than the ModA pocket (Fig. 7B, panels II and III). Moreover, the comparison of pocket residues after superimposition of the structures revealed that, despite the hydrogen bonds for interactions, residues from the pocket and those responsible for ion coordination are not conserved between both proteins (Fig. 7B, panel IV). Specifically, the presence and occupancy of the tryptophan W¹⁹⁴ and serine S¹³² in Sbp makes the pocket volume of this protein smaller than that shown in ModA, which has a tyrosine (Y¹⁷⁰) in the corresponding position (Fig. 7B, panels V and VI).

Conclusion.

The data presented in this work show, for the first time, that the putative promoter region of the operon *sbpcysUWA* is activated during all periods of growth in vitro and in vivo. In

addition, high levels of Sbp are present in *X. citri* periplasmic extracts, suggesting that the periplasmic-binding protein and its related ABC transporter are needed even during late periods of infection, indicating the relevance of the ion for bacterium growth and infection. Moreover, we solved the three-dimensional structure of Sbp at 1.14 Å resolution with a sulfate inside and showed the high affinity and specificity for the anion.

MATERIALS AND METHODS

Computational analysis.

The nucleotide sequence of the *sbp* gene was obtained at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (GI: 14881153). Search of Sbp ortholog sequences was carried out using the KEGG2 program of the Bioinformatics Center Institute for Chemical Research Kyoto University. Amino acid sequence alignments were performed using ClustalW (Thompson et al. 1994). Prediction of signal peptide and transmembrane sequences were performed by SignalP and DAS programs, respectively. Protein parameters of the *X. citri* Sbp were calculated with programs available at the ExPASy Molecular Biology server.

Cloning.

The nucleotide sequence of the *X. citri sbp* gene (XAC1017), encoding the mature protein without the first 72 base pairs (bp), corresponding to a predicted 24 amino acid signal peptide, was amplified by PCR, using a forward primer (5' GTGCTGCA TATGGCGCAGACCGCC 3') and a reverse primer (5' CGCCAAGCTTTCAATCCTTCAG 3') with Platinum high fidelity *Taq* polymerase (Invitrogen), based on standard

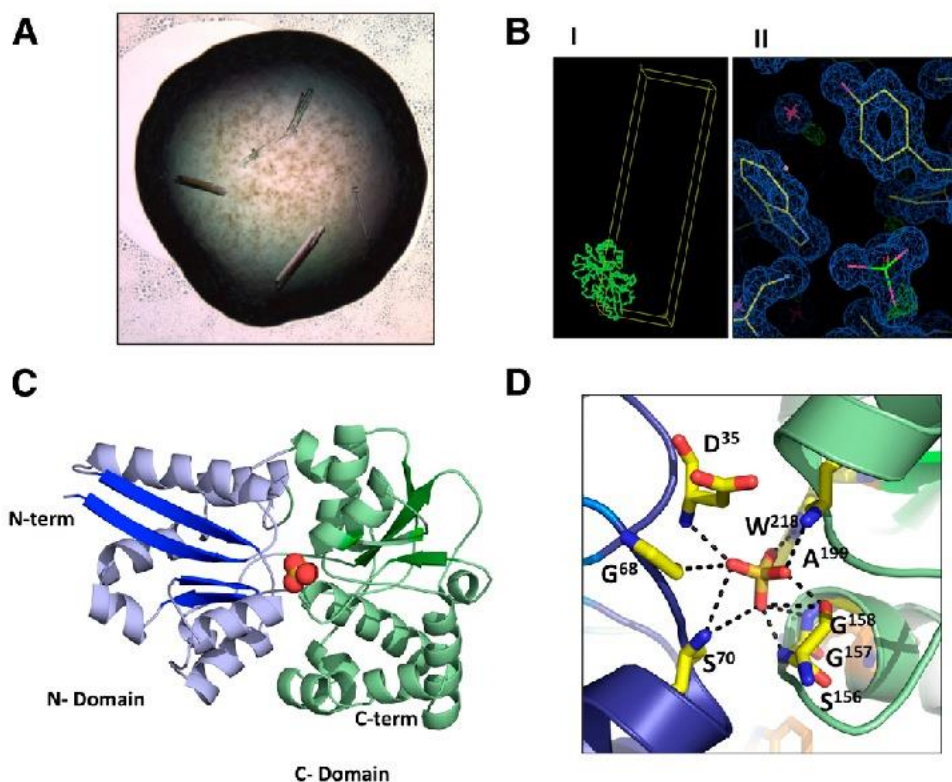


Fig. 5. The three-dimensional structure of *Xanthomonas citri* sulfate-binding protein (Sbp). **A**, *X. citri* Sbp rod crystals diffracted at 1.14 Å; 2 μl of a sample containing 8.9 mg of *X. citri* Sbp in 1 ml of 0.05 M Tris, pH 8.0, and 0.3 μM MgSO_4 were mixed to 2 μl of 0.2 potassium sulfate and 30% PEG 3350. **B**, Part I, One molecule of Sbp as found in the asymmetric unit and, part II, detail of Sbp showing the electronic density. **C**, Three-dimensional structure of Sbp showing the N (blue) and C domains (green) and the sulfate ion in the cleft as red dot spheres. β -sheet structures are detached in darker blue and green in domains N and C, respectively. **D**, Detail of the sulfate-binding site residues in yellow stick evidencing the oxanion interactions.

amplification conditions. The forward primer included one *NdeI* restriction site, while the reverse primer encoded one *HindIII* restriction site (underlined on primer sequences). The resulting amplified fragment, corresponding to 945 bp, was

Table 1. Data processing statistics of the *Xanthomonas citri citri* sulfate-binding protein (SBP) crystal and refinement data from its structure^a

Parameters	Values
Data collection and processing	
Synchrotron and beamline	Diamond Light Source I02
Date of data collection	30.04.2016
Data collection temperature (K)	100
Wavelength (Å)	0.979490
Resolution range (Å)	30.16 – 1.14 (1.181 – 1.14)
Space group	C121
Unit cell (a, b, c) (Å)	183.06, 54.54, 34.2
(α, β, γ) (°)	90.0, 98.9, 90.0
Total number of reflections	371,345 (16,855)
Number of unique reflections	112,643 (6,232)
Multiplicity	3.7 (2.7)
Completeness (%)	93.3 (70.3)
Mean I/sigma(I)	15.2 (1.9)
Wilson B factor (Å ²)	11.4
R _{merge}	0.039 (0.650)
R _{meas}	0.046 (0.800)
R _{pim}	0.025 (0.459)
CC _{1/2}	0.998 (0.527)
Refinement	
R-work	0.1776 (0.2933)
R-free	0.1905 (0.2981)
Number of nonhydrogen atoms	2725
Macromolecules	2499
Ligands	10
Water	216
Protein residues	314
RMSD ^b (bonds) (Å)	0.006
RMSD (angles) (%)	1.06
Ramachandran favored (%)	98
Ramachandran allowed (%)	2
Ramachandran outliers (%)	0
Clashscore	1.61
Average Bfactor (Å ²)	18.10
Macromolecules	17.60
Ligands	15.60
Solvent	23.50

^a Values in parenthesis correspond to data regarding the last resolution.

^b RMSD = root mean square displacement.

inserted into pGEM T-Easy vector (Promega) and was cleaved with *NdeI* and *HindIII* enzymes (Fermentas) for subsequent cloning into the expression vector pET28a (Novagen), previously digested with the same enzymes. After transformation of chemically competent *E. coli* DH5α cells, 10 recombinant colonies were subjected to restriction analysis and nucleotide sequencing, using the methods of Sanger et al. (1977). The recombinant plasmid pET28a.sbp was further purified in larger quantities and was transformed into the *E. coli* BL21 (DE3) strain (Novagen).

Production of the recombinant *X. citri* Sbp.

Cultures of the recombinant pET28a.sbp-transformed *E. coli* BL21 (DE3) strain were prepared aerobically in Erlenmeyer flasks, with LB broth medium supplemented with 50 µg of kanamycin per milliliter until midlog phase (optical density at 600 nm of 0.5 to 0.6), when isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; Sigma) was added to a final concentration of 0.1 mM. The synthesis of the recombinant protein was induced aerobically (200 rpm) for 2 h at 37°C. Cells were collected by centrifugation at 8,000 × g for 15 min at 4°C and were stored at –20°C for approximately 16 h before lysis. The cell pellets were suspended in 20 ml of solubilization buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 0.1% Triton X-100 [final concentration of 30 mg/ml]) for 30 min in an ice bath in the presence of lysozyme (final concentration of 0.1 mg/ml). Cells were sonically disrupted in a Branson digital sonifier (model 450), and soluble fractions were separated from the nonsoluble material by centrifugation at 16,000 × g for 40 min at 4°C. The Sbp protein was purified, in batch, from 20 ml of soluble fraction by immobilized metal affinity chromatography, using nickel-charged resin from GE (HiTrap HP, according to manufacturer's instructions). The charged resin was washed with 10-column volumes of buffer 1 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl), followed by step gradient elution with buffers containing increasing concentrations of imidazole (20 to 500 mM). To eliminate aggregates and contaminants from the previous purification, a size-exclusion chromatography was performed in buffer 2 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl) with a Superdex 16/60 200 column (GE Healthcare). The fractions containing eluted protein were concentrated with Ultrafree MWCO 10,000 centrifugal filters (Amicon Millipore), to a final concentration of 20 mg/ml. Samples of 15 µl of the eluted protein fractions containing approximately 2 mg per milliliter

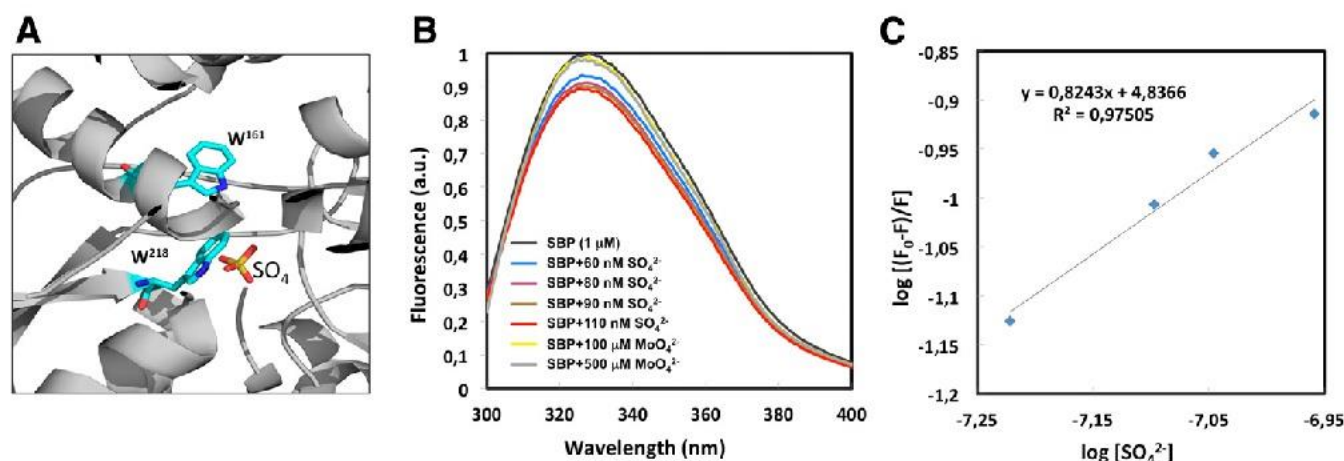


Fig. 6. Fluorescence and analysis of sulfate binding on *Xanthomonas citri* sulfate-binding protein (Sbp). **A**, Detail of the Sbp ligand-binding site evidencing the two tryptophans close to the ligand. **B**, Fluorescence emission spectra of Sbp in the presence of different concentrations of SO_4^{2-} . Sbp (1 µM) was titrated with SO_4^{2-} (0, 60, 80, 90, 110 nM) or MoO_4^{2-} (100 and 500 µM) and was excited at 295 nm at 20°C. **C**, Determination of K_D and n for sulfate binding to SBP by fluorimetric data.

were analyzed by SDS-PAGE, using 12% acrylamide gels stained with Coomassie blue. Protein concentration was spectrophotometrically determined, using the method by Edelhoch (1967). To evaluate the polydispersity of the samples, a 1 mg/ml concentration of size-exclusion chromatograph-purified Sbp was centrifuged at $10,000 \times g$ for 30 min and was then analyzed by DynaPro99 DLS equipment (Wyatt Technology Corp.) at 18°C. It was collected for 300 accumulations with 10 s each. The samples that presented less than 20% polydispersity were selected for crystallization trials.

Crystallization and structure determination.

The purified recombinant Sbp, diluted in 6.7 mM Tris-HCl, pH 8.0, at the final concentration of 8.9 mg/ml, was submitted to crystallization trials at 18°C, using the sitting-drop vapor-diffusion technique, using the Oryx6 (Douglas Instruments, Ltd.) automatic protein crystallization system at the Crystallographic X-Ray Facility of the Department of Biochemistry, University of Cambridge, United Kingdom. The solution in which Sbp formed a rod crystal was 0.2 M potassium sulfate, 20% (wt/vol) PEG3350, which provided protection against ice formation. Crystallographic data from this single frozen crystal were collected at the protein crystallography beamline I02 from Diamond Light Source, using a Pilatus 6M detector. Datasets of

Sbp were indexed and integrated using XDS (Kabsch 2010) and molecular replacement was carried out with Phaser MR34 (McCoy et al. 2007), taking the *S. typhimurium* Sbp (PDB code 1SBP) (He and Quiococho 1993), which shares 65% amino acid sequence identity, as starting model. The model was refined using PHENIX 1.11.1 (Adams et al. 2010) and was checked by PROCHECK (Laskowski et al. 1993). The structural coordinates for *X. citri* Sbp were deposited in PDB with the accession code 5UM2. The program COOT (Emsley and Cowtan 2010) was used for model building. All pictures were generated with the PYMOL software (Delano 2002).

CD assays.

Measurements were carried out with a JASCO J-810 spectropolarimeter equipped with a Peltier-type temperature controller and a thermostated cell holder, interfaced with a thermostatic bath. For far-UV analysis, spectra were recorded in 0.1-cm path length quartz cells at a protein concentration of 5 μ M in 10 mM Tris-HCl buffer at pH 8.0, in the absence or presence of 10 μ M of sodium sulfate or sodium molybdate. For near-UV analysis, spectra were recorded in 1-cm path length quartz cells at a protein concentration of 18 μ M in the absence or presence of the ligands at 36 μ M. Twenty consecutive scans were compiled and the average spectra was stored. The data

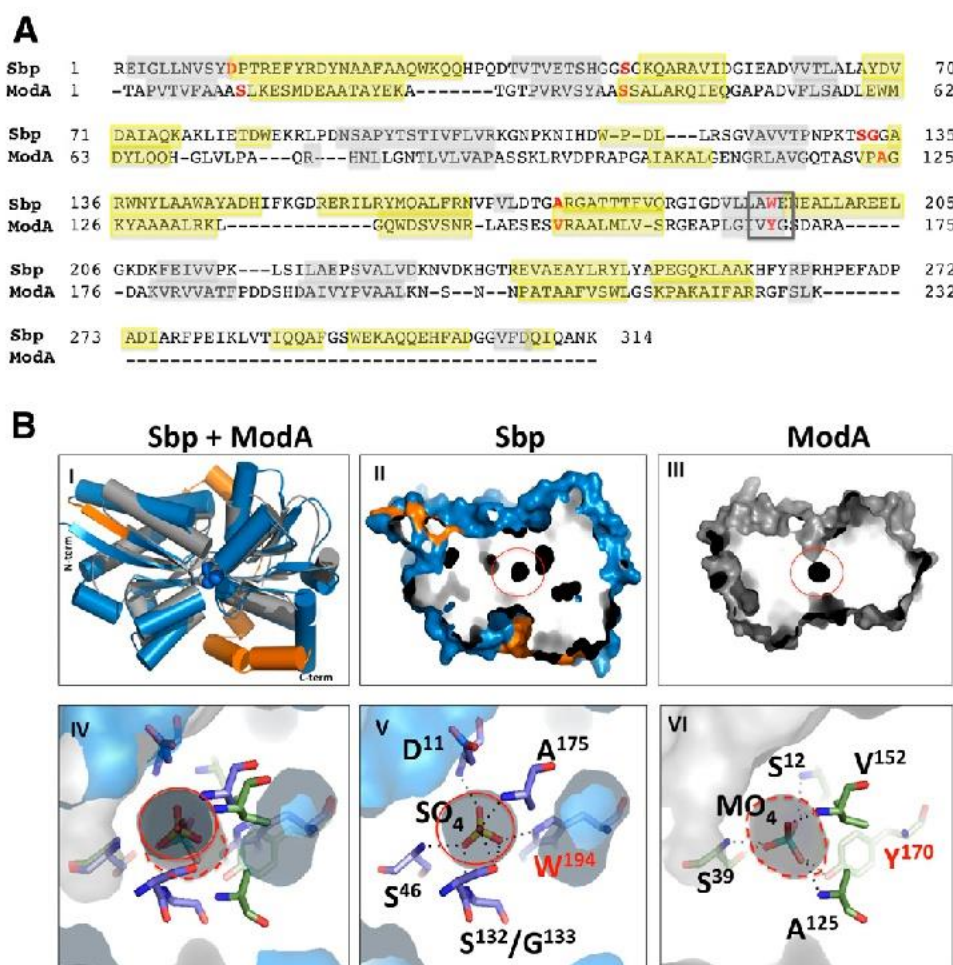


Fig. 7. Comparison between *Xanthomonas citri* sulfate-binding protein (Sbp) and ModA proteins. **A**, The amino acid sequence structure-based alignment of ModA and Sbp. Amino acids forming secondary structures as β -sheets and α -helices are colored in gray and yellow, respectively. Residues that interact with the oxyanions are shown in red and a black box shows the location of W¹⁹⁴ and Y¹²⁵. **B**, Structural comparison between Sbp and ModA. Panel I, Structural alignment of Sbp (blue) and ModA (gray) shown as cartoon. Extra secondary structures in Sbp are shown in orange. Panels II and III, The internal surfaces and pockets (red circles) of Sbp and ModA, respectively. Panel IV, Superimposition of the ligand-binding pocket and residues (stick) in the two structures. Panels V and VI, Detail of the residues in Sbp and ModA pockets, respectively. The residues W¹⁹⁴ and Y¹²⁵ and pockets are shown in red (full for Sbp and dashed line for ModA).

were corrected for the baseline contribution of the buffer and the observed ellipticities were converted into the mean residue ellipticities (θ) based on a mean residue molecular mass of 37.5 Da. The T_m represents the temperature at the midpoint of the unfolding transition. The secondary structure was estimated from fitted far-UV CD spectra, using the CDNN software package (Böhm et al. 1992).

Intrinsic tryptophan fluorescence.

Sulfate binding was followed by fluorescence measurements using an Aminco BOWMAN series 2 spectrofluorometer. Excitation and emission bandwidths were 4 and 8 nm, respectively. The fluorescence cell (1 × 1 cm) was mounted on a thermostatic holder. Tryptophan fluorescence was measured with an excitation wavelength of 295 nm and the emission spectra were recorded between 300 and 450 nm. All measurements were performed in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, at 20°C, with the protein at a concentration of 1 µM, calculated using the extinction coefficient for a molecular weight of 37.5 kDa. Sodium sulfate was titrated to the protein solution to give a final ligand concentration in the range of 60 to 110 nM and the respective emission spectra were recorded. As a control, putative effects on Sbp fluorescence caused by the sulfate analog sodium molybdate up to 500 µM were also evaluated. The measured fluorescence data were corrected for dilution and inner filter effects (Mertens and Kägi 1979). The obtained fluorescence data were normalized and, in order to estimate the number of sulfate binding sites to Sbp, n and the binding constant (K_b) data were further evaluated, using equation 1:

$$\log \left[\frac{(F_0 - F)}{F} \right] = \log K_b + n \log [\text{ligand}],$$

where F_0 and F are the values of Sbp fluorescence intensity on λ_{\max} (wavelength of maximum intensity of apo-Sbp fluorescence) in the absence and presence of the ligand, respectively, K_b is the binding constant, and [ligand] is the ligand concentration (Bourassa et al. 2010; Pinto et al. 2010).

In vivo and in vitro transcriptional activation of the p1017 promoter.

To analyze the activation of the *sbpcysUWA* operon, a fragment of 776 bp upstream of the start codon from the *sbp* gene (XAC1017), containing the p1017 promoter sequence as predicted by BProm Software, was amplified by PCR, using the oligonucleotides 5'-GGGCCCATGTACCAGCGCGTTG TATTTGCG-3' and 5'-CCATGGAACGGAAACGGGAA TATGTCACGACG-3' as forward and reverse primers, respectively. The amplified fragment was cloned into pGEM/EGFP (Barbosa and Benedetti 2007), using the restriction enzymes *ApaI* and *NcoI* to obtain the pGEM.p1017EGFP vector, which had the p1017-EGFP cassette subcloned into the pKX33 vector (Baldini et al. 1999). The final vector for expression in *X. citri* was pKX33.p1017EGFP and contained the EGFP gene (Chalfie et al. 1994) under control of the p1017 promoter. To measure the activity of the promoter, *X. citri* cells were transformed with the pKX33.p1017EGFP vector and were inoculated in LB broth for growth for 24 h. The EGFP fluorescence was measured in 96-well plates, using 100 µl of cultures in the EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer) and were plotted as a relative quantification of the fluorescence. The bacteria also were observed in a fluorescence microscopy. Similarly, to analyze the p1017 promoter activation in vivo, *Citrus sinensis* leaves were infected with *X. citri* wild type carrying the pKX33.p1017EGFP vector. The fluorescence of *X. citri* carrying the plasmid pKX33.p1017EGFP and extracted from infected citrus leaves, according to Vanini and collaborators

(2008), was measured after 7 or 10 days or 2 weeks from the infection.

Samples for proteomics analysis.

Production of native Sbp in *X. citri* was monitored in three different growth conditions. After cell growth during overnight incubation at 30°C and 200 rpm in LB broth, cultures were washed three times with sterile water to remove media contamination and were normalized for inoculation at a rate of 10⁵ CFU/ml in LB broth (rich medium), M9 minimum medium (with 2 mM magnesium sulfate), and M9.1/2 minimum medium (with 1 mM magnesium sulfate). Cultures were maintained at 30°C, 200 rpm, for 72 hs. After growth, cells were harvested by centrifugation 6700 × *g* for 20 min and were resuspended, according to Pegos and collaborators (2014). The supernatants were quantified using the method by Bradford (1976). Samples containing 100 µg of protein were applied in 12% SDS-PAGE running at 120 V for 2 hs and were stained with Coomassie blue. The regions corresponding to the range between 25 and 45 kDa were excised from gel and were submitted to trypsin digestion, as previously described (Paes-Leme et al. 2012). The runs were performed at the Mass Spectrometry Laboratory facility at the Brazilian National Laboratory of Biosciences (LNBio), Centro de Pesquisas em Energia e Materiais, Campinas, Brazil.

Tandem mass spectrometry (MS/MS) and data analysis.

The peptide mixtures were separated using a column C18 Rp-nano UPLC (nanoAcquity; Waters Corp) coupled to a Q-TOF Ultima API mass spectrometer (Waters Corp.) with a nano electrospray source at a flow rate 0.6 nl/min. The digested proteins were submitted to a gradient of 2 to 90% of acetonitrile in 0.1% formic acid over 45 min. The equipment was set to 3.5 kV, the cone voltage 30 V, and the temperature 100°C. The mode was 'top three', in which one MS spectrum is acquired, followed by MS/MS of the three most intense peaks. Technical samples and spectra were acquired using MassLynx software and the raw data files were converted by Mascot Distiller v.2.3.2.0 (Matrix Science Ltd.) for searching against the *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306 database (NCBI taxonomy identification number 190486), using mascot with carbamidomethylation as fixed modification, oxidation of methionine as a variable modification, one trypsin missed cleavage, and a tolerance of 0.1 Da for the precursor and fragment ions. For protein quantity measurement, the mascot output files were analyzed in Scaffold Q+ (version 3.6 Proteomic Software Inc.), also used to calculate the normalized spectral counts and to validate peptide and protein identifications considering the parameters to obtain a false discovery rate of less than 1% than protein and peptides, as previously described (Nesvizhskii et al. 2003).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Procs. 2013/09172-9 and 2013/16094-4), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Centro Nacional de Pesquisa e Energia em Materiais (CNPem). We thankfully acknowledge the technical support from LNBio (Campinas) and M. Hyvonen for support in data collection and acquisition. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

LITERATURE CITED

Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J.,

- Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. H. 2010. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66: 213-221.
- Aguilar-Barajas, E., Diaz-Perez, C., Ramirez-Diaz, M. I., Riveros-Rosas, H., and Cervantes, C. 2011. Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions. *Biometals: An international journal on the role of metal ions in biology.* Biochem. Med. 24:687-707.
- Balan, A., Santacruz-Pérez, C., Moutran, A., Ferreira, L. C., Neshich, G., and Gonçalves Barbosa, J. A. 2008. Crystallographic structure and substrate-binding interactions of the molybdate-binding protein of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Biochim. Biophys. Acta* 1784:393-399.
- Baldini, R. L., Tahara, S. T., and Rosato, Y. B. 1999. A rolling-circle miniplasmid of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*: The nucleotide sequence and its use as a cloning vector. *Plasmid* 42:126-133.
- Barbosa, R. L., and Benedetti, C. E. 2007. BigR, a transcriptional repressor from plant-associated bacteria, regulates an operon implicated in biofilm growth. *J. Bacteriol.* 189:6185-6194.
- Bhave, D. P., Muse, W. B., 3rd, and Carroll, K. S. 2007. Drug targets in mycobacterial sulfur metabolism. *Infect. Dis. Drug Targets* 7:140-158.
- Blanvillain, S., Meyer, D., Boulanger, A., Lautier, M., Guynet, C., Denancé, N., Vasse, J., Lauber, E., and Arlat, M. 2007. Plant carbohydrate scavenging through tonB-dependent receptors: A feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS One* 2:e224.
- Böhm, G., Muhr, R., and Jaenicke, R. 1992. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.* 5: 191-195.
- Bourassa, P., Kanakis, C. D., Tarantilis, P., Pollissiou, M. G., and Tajmir-Riahi, H. A. 2010. Resveratrol, genistein, and curcumin bind bovine serum albumin. *J. Phys. Chem. B* 114:3348-3354.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brown, J. S., Gilliland, S. M., and Holden, D. W. 2001. A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Mol. Microbiol.* 40:572-585.
- Brunings, A. M., and Gabriel, D. W. 2003. *Xanthomonas citri*: Breaking the surface. *Mol. Plant Pathol.* 4:141-157.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.
- Cheng, G., Karunakaran, R., East, A. K., and Poole, P. S. 2016. Multiplicity of sulfate and molybdate transporters and their role in nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Rlv3841. *Mol. Plant-Microbe Interact* 29:143-152.
- Cook, A. M., Laue, H., and Junker, F. 1998. Microbial desulfonation. *FEMS Microbiol. Rev.* 22:399-419.
- Delano, W. L. 2002. The PyMOL Molecular Graphics System. <http://pymol.org>.
- Dudev, T., and Lim, C. 2004. Oxyanion selectivity in sulfate and molybdate transport proteins: An *ab initio*/CDM study. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 10296-10305.
- Edelhoc, H. 1967. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6:1948-1954.
- Eichhorn, E., van der Ploeg, J. R., and Leisinger, T. 2000. Deletion analysis of the *Escherichia coli* taurine and alkanesulfonate transport systems. *J. Bacteriol.* 182:2687-2695.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. 2010. Features and development of Coot. *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.* 66:486-501.
- García-Ochoa, F., Santos, V. E., Casas, J. A., and Gómez, E. 2000. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. *Biotechnol. Adv.* 18:549-579.
- Garmory, H. S., and Titball, R. W. 2004. ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. *Infect. Immun.* 72:6757-6763.
- Guzzo, C. R., Silva, L. R., Galvão-Botton, L. M., Barbosa, J. A., and Farah, C. S. 2006. Expression, crystallization and preliminary crystallographic analysis of SufE (XAC2355) from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Acta Cryst. F* 62:268-270.
- Hamorsky, K. T., Ensor, C. M., Pasini, P., and Daunert, S. 2012. A protein switch sensing system for the quantification of sulfate. *Anal. Biochem.* 421:172-180.
- He, J. J., and Quijcho, F. A. 1993. Dominant role of local dipoles in stabilizing uncompensated charges on a sulfate sequestered in a periplasmic active transport protein. *Protein Sci.* 2:1643-1647.
- Kabsch, W. 2010. XDS. *Acta Cryst. D* 66:125-132.
- Kemner, J. M., Liang, X., and Nester, E. W. 1997. The *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene *chvE* is part of a putative ABC-type sugar transport operon. *J. Bacteriol.* 179:2452-2458.
- Kertesz, M. A. 2000. Riding the sulfur cycle—Metabolism of sulfonates and sulfate esters in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 135-175.
- Kertesz, M. A. 2001. Bacterial transporters for sulfate and organosulfur compounds. *Res. Microbiol.* 152:279-290.
- Kocsis, M. G., Nolte, K. D., Rhodes, D., Shen, T. L., Gage, D. A., and Hanson, A. D. 1998. Dimethylsulfoniopropionate biosynthesis in *Spartina alterniflora* L.: Evidence that S-methylmethionine and dimethylsulfoniopropylamine are intermediates. *Plant Physiol.* 117:273-281.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. 1993. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26:283-291.
- Laurence, J. A., and Aluisio, A. L. 1981. Effects of sulfur dioxide on expansion of lesions caused by *Corynebacterium nebraskense* in maize and by *Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis* in soybean. *Phytopathology J.* 71:445-448.
- Li, J., and Wang, N. 2011. Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. *PLoS One* 6:e21804.
- Matthews, B. W. 1968. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* 33: 491-497.
- Mauchline, T. H., Fowler, J. E., East, A. K., Sartor, A. L., Zaheer, R., Hosie, A. H., Poole, P. S., and Finan, T. M. 2006. Mapping the *Sinorhizobium meliloti* 1021 solute-binding protein-dependent transportome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:17933-17938.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. 2007. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* 40:658-674.
- Mehta, A., and Rosato, Y. B. 2001. Differentially expressed proteins in the interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* with leaf extract of the host plant. *Proteomics* 1:1111-1118.
- Mertens, M. L., and Kägi, J. H. 1979. A graphical correction procedure for inner filter effect in fluorescence quenching titrations. *Anal. Biochem.* 96:448-455.
- Murphy, T. F., Brauer, A. L., Johnson, A., and Kirkham, C. 2016. ATP-binding cassette (ABC) transporters of the human respiratory tract pathogen, *Moraxella catarrhalis*: Role in virulence. *PLoS One* 11: e0158689.
- Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E., and Aebersold, R. 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 75:4646-4658.
- Otsuka, T., Kirkham, C., Johnson, A., Jones, M. M., and Murphy, T. F. 2014. Substrate binding protein SBP2 of a putative ABC transporter as a novel vaccine antigen of *Moraxella catarrhalis*. *Infect. Immun.* 82: 3503-3512.
- Paes Leme, A. F., Sherman, N. E., Smalley, D. M., Sizukusa, L. O., Oliveira, A. K., Menezes, M. C., Fox, J. W., and Serrano, S. M. 2012. Hemorrhagic activity of HF3, a snake venom metalloproteinase: Insights from the proteomic analysis of mouse skin and blood plasma. *J. Proteome Res.* 11:279-291.
- Paritala, H., and Carroll, K. S. 2013. New targets and inhibitors of mycobacterial sulfur metabolism. *Infect. Disord. Drug Targets* 13: 85-115.
- Pegos, V. R., Nascimento, J. F., Sobreira, T. J., Pauletti, B. A., Paes-Leme, A., and Balan, A. 2014. Phosphate regulated proteins of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: A proteomic approach. *J. Proteomics* 108:78-88.
- Pereira, C. T., Moutran, A., Fessel, M., and Balan, A. 2015. The sulfur/sulfonates transport systems in *Xanthomonas citri* pv. *citri*. *BMC Genomics* 16:524.
- Pinto, M. C., Duque, A. L., and Macías, P. 2010. Fluorescence spectroscopic study on the interaction of resveratrol with lipoxygenase. *J. Mol. Struct.* 980:143-148.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:5463-5467.
- Scheffel, F., Demmer, U., Warkentin, E., Hülsmann, A., Schneider, E., and Ermler, U. 2005. Structure of the ATPase subunit CysA of the putative sulfate ATP-binding cassette (ABC) transporter from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *FEBS Lett.* 579:2953-2958.
- Schulte, R., and Bonas, U. 1992. A *Xanthomonas* pathogenicity locus is induced by sucrose and sulfur-containing amino acids. *Plant Cell* 4:79-86.
- Sekowska, A., Kung, H.-F., and Danchin, A. 2000. Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: Facts and fiction. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2:145-177.

- Soares, M. R., Facincani, A. P., Ferreira, R. M., Moreira, L. M., de Oliveira, J. C., Ferro, J. A., Ferro, M. I., Meneghini, R., and Gozzo, F. C. 2010. Proteome of the phytopathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: A global expression profile. *Proteome Sci.* 8:55.
- Stec, E., Witkowska-Zimny, M., Hryniewicz, M. M., Neumann, P., Wilkinson, A. J., Brzozowski, A. M., Verma, C. S., Zaim, J., Wysocki, S., and Bujacz, G. D. 2006. Structural basis of the sulphate starvation response in *E. coli*: Crystal structure and mutational analysis of the cofactor-binding domain of the Cbl transcriptional regulator. *J. Mol. Biol.* 364:309-322.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Tófoli de Araújo, F., Bolanos-Garcia, V. M., Pereira, C. T., Sanches, M., Oshiro, E. E., Ferreira, R. C., Chigardze, D. Y., Barbosa, J. A., de Souza Ferreira, L. C., Benedetti, C. E., Blundell, T. L., and Balan, A. 2013. Structural and physiological analyses of the alkanesulphonate-binding protein (SsuA) of the citrus pathogen *Xanthomonas citri*. *PLoS One* 8:e80083.
- van der Ploeg, J. R., Iwanicka-Nowicka, R., Bykowski, T., Hryniewicz, M. M., and Leisinger, T. 1999. The *Escherichia coli* *ssuEADCB* gene cluster is required for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates and is regulated by the transcriptional activator Cbl. *J. Biol. Chem.* 274: 29358-29365.
- van der Ploeg, J. R., Iwanicka-Nowicka, R., Kertesz, M. A., Leisinger, T., and Hryniewicz, M. M. 1997. Involvement of CysB and Cbl regulatory proteins in expression of the *tauABCD* operon and other sulfate starvation-inducible genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179: 7671-7678.
- Vanini, M. M., Spisni, A., Sforça, M. L., Pertinhez, T. A., and Benedetti, C. E. 2008. The solution structure of the outer membrane lipoprotein OmlA from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals a protein fold implicated in protein-protein interaction. *Proteins* 71:2051-2064.

AUTHOR-RECOMMENDED INTERNET RESOURCES

Bioinformatics Center Institute for Chemical Research Kyoto University
 GenomeNet database: www.genome.jp
 DAS Transmembrane Prediction server:
<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS>
 Expasy Molecular Biology server: <http://www.expasy.org>
 SignalP server: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>
 Softberry's BPro software: <http://www.softberry.com>

ANEXO 03- Structural and physiological analyses of the alkanesulphonate-binding protein (SsuA) of the citrus pathogen *Xanthomonas citri*.

(O qual foi realizado todos ensaios funcionais e a construção do mutante complementar e os ensaios do mesmo)

Structural and Physiological Analyses of the Alkanesulphonate-Binding Protein (SsuA) of the Citrus Pathogen *Xanthomonas citri*

Fabiano Tófoli de Araújo¹, Victor M. Bolanos-Garcia², Cristiane T. Pereira³, Mario Sanches⁴, Elisa E. Oshiro¹, Rita C. C. Ferreira¹, Dimitri Y. Chigardze², João Alexandre Gonçalves Barbosa⁵, Luís Carlos de Souza Ferreira¹, Celso E. Benedetti³, Tom L. Blundell², Andrea Balan^{3*}

1 Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, **3** Laboratório Nacional de Biociências, Centro de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo, Brazil, **4** Monte Sinai Hospital, Toronto, Ontario, Canada, **5** Departamento de Genética, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

Abstract

Background: The uptake of sulphur-containing compounds plays a pivotal role in the physiology of bacteria that live in aerobic soils where organosulfur compounds such as sulphonates and sulphate esters represent more than 95% of the available sulphur. Until now, no information has been available on the uptake of sulphonates by bacterial plant pathogens, particularly those of the *Xanthomonas* genus, which encompasses several pathogenic species. In the present study, we characterised the alkanesulphonate uptake system (Ssu) of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306 strain (*X. citri*), the etiological agent of citrus canker.

Methodology/Principal Findings: A single operon-like gene cluster (*ssuEDACB*) that encodes both the sulphur uptake system and enzymes involved in desulphurisation was detected in the genomes of *X. citri* and of the closely related species. We characterised *X. citri* SsuA protein, a periplasmic alkanesulphonate-binding protein that, together with SsuC and SsuB, defines the alkanesulphonate uptake system. The crystal structure of SsuA bound to MOPS, MES and HEPES, which is herein described for the first time, provides evidence for the importance of a conserved dipole in sulphate group coordination, identifies specific amino acids interacting with the sulphate group and shows the presence of a rather large binding pocket that explains the rather wide range of molecules recognised by the protein. Isolation of an isogenic *ssuA*-knockout derivative of the *X. citri* 306 strain showed that disruption of alkanesulphonate uptake affects both xanthan gum production and generation of canker lesions in sweet orange leaves.

Conclusions/Significance: The present study unravels unique structural and functional features of the *X. citri* SsuA protein and provides the first experimental evidence that an ABC uptake system affects the virulence of this phytopathogen.

Citation: Tófoli de Araújo F, Bolanos-Garcia VM, Pereira CT, Sanches M, Oshiro EE, et al. (2013) Structural and Physiological Analyses of the Alkanesulphonate-Binding Protein (SsuA) of the Citrus Pathogen *Xanthomonas citri*. PLoS ONE 8(11): e80083. doi:10.1371/journal.pone.0080083

Editor: Andreas Hofmann, Griffith University, Australia

Received: April 22, 2013; **Accepted:** October 9, 2013; **Published:** November 25, 2013

Copyright: © 2013 Tófoli de Araújo, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and the Conselho Nacional de Pesquisas. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: andrea.balan@lnbio.cnpem.br

Introduction

All living organisms require sulphur for the biosynthesis of amino acids (cysteine and methionine) and cofactors such as glutathione, coenzyme A and coenzyme M [1]. Bacteria must either obtain these molecules directly from the environment or synthesise them using inorganic (e.g., sulphate) or organic (e.g., sulphonates) sulphur sources [2,3]. In aerobic soils, the sulphur content is almost entirely represented by sulphonates and sulphate esters of various organic compounds, with inorganic sulphur representing less than 1–5% of the available element [4]. Under such conditions, several bacterial species are known to express proteins required for the uptake of organic sulphur-containing substances such as sulphate esters, sulphamates, sulphonates and alkanesulphonates [1,5,6].

In *Escherichia coli*, the uptake of sulphur-containing organic compounds requires the expression of two ATP binding cassette (ABC) transport systems: the Tau system, which is specifically involved in the uptake of taurine, and the Ssu system, which mediates the uptake of other aliphatic sulphonates [5,7]. The Ssu system is encoded by a single operon encompassing five cistrons, *ssuEDACB*, that encode the three components of the uptake system, which are the periplasmic alkanesulphonate-binding protein (SsuA), the membrane permease protein (SsuC) and the nucleotide-binding protein (SsuB), and two cytoplasmic proteins involved in sulphur release, NAD(P)H flavin mononucleotide oxidoreductase (SsuD) and the FMN-dependent sulphonate monooxygenase (SsuE) [7]. Structural analysis of the Ssu uptake system has been restricted to the recent description of the substrate-free *E. coli* SsuA protein [8]. The SsuA protein is similar

to other periplasmic ABC transporters in which two globular domains form a cleft in which the ligand binds and from which it is subsequently translocated to the membrane-bound compartment. However, no information is presently available about the structure of the SsuA protein-ligand complex, the interactions of specific amino acid residues with the alkanesulphonate substrates or the molecular features that allow various alkanesulphonate molecules to fit into the protein's ligand-binding pocket.

In addition to the Ssu system of *E. coli*, functional Ssu uptake systems have also been reported in *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida*, further supporting the relevant physiological role of this nutrient uptake system in soil-inhabiting bacteria [6,9]. Despite the apparently relevant physiological role of the Ssu system, no information is available regarding the uptake of organic sulphur-containing compounds by bacterial plant pathogens. Indeed, once absorbed by plants as inorganic sulphate, sulphur is rapidly converted into complex organic molecules such as proteins and sulphonates or to sulphoquinovose in sulfolipids of thylakoid membranes [7]. However, no information regarding the role of aliphatic sulphonate uptake in the growth and virulence of phytopathogens is presently available.

The *Xanthomonas* genus encompasses 27 different bacterial species and over 140 pathovars that interact with more than 400 plant species, including several economically relevant species [10,11]. *Xanthomonas citri*, the causative agent of citrus canker, is capable of infecting all citrus cultivars, although different citrus species may show distinct susceptibility to the disease, as illustrated by the high susceptibility of sweet orange (*Citrus sinensis*) and the lower susceptibility of mandarin species [12]. Canker is one of the most economically damaging diseases of citrus plants; it begins with the epiphytic colonisation of the leaf surface followed by the entrance of the pathogen into leaf tissue through stomata or wounds. Upon entrance into the plant mesophyll, the bacterium induces cell enlargement and multiplication (hyperplasia) followed by a water-soaking phenotype and the formation of blister-like lesions approximately 4 days after infection. The production of highly hygroscopic xanthan gum helps bacteria increase the water adsorption of the plant through the capillary effect from xylem, leading to disruption of the plant epidermis and formation of yellow spongy pustules that become brown and corky with time [13].

In the present study, we investigated for the first time the presence of alkanesulphonate uptake systems in the *Xanthomonas* genus, with particular emphasis on the system encoded by *X. citri*. A single operon-like gene cluster (*ssuEDACB*) encoding both the uptake system and the intracellular enzymes involved in sulphur release was detected in the genome of the *X. citri* 306 strain but not in other *Xanthomonas* species with the exception of the closely related *X. fuscans*. The structure of SsuA in complex with MOPS, MES and HEPES was determined, showing the importance of a conserved dipole at the substrate cleft for sulphate group coordination and the presence of a rather spacious ligand pocket, partially filled with water molecules, that permits the binding of alkanesulphonates of quite different molecular sizes, charges and shapes. We also showed that an active alkanesulphonate uptake system is required for the growth of *X. citri* under sulphate-restricted conditions. Finally, generation of an *ssuA*-knockout mutant of the *X. citri* 306 strain showed that a defective alkanesulphonate uptake system affects both xanthan gum production and the generation of canker lesions in a susceptible citrus host. Altogether, the present work represents the first structural and functional characterisation of an alkanesulphonate uptake system of a bacterial plant pathogen and demonstrates that this

nutrient uptake system plays a role in the pathogenesis of *X. citri*.

Results

The alkanesulphonate uptake system in *Xanthomonas*

A search of the available *Xanthomonas* genomes for genes involved in the uptake of alkanesulphonates revealed 4 species (*X. citri*, *X. fuscans*, *X. gardneri*, and *X. campestris*) in which a single operon-like gene cluster sharing similarity with *E. coli* *ssu* genes was found (Figure 1). The *X. citri* *ssu* genes showed a similar genetic organisation to that of the *ssu* operon found in *E. coli* with the exception that *ssuD* and *ssuA* were present in inverted positions in the two species. The fact that the putative functional organisations of these genes have been maintained in two citrus pathogens indicates that the *ssu* genes have a recent evolutionary history in the genus. Further structural and functional analyses of the alkanesulphonate uptake genes concentrated on *X. citri* SsuA, the alkanesulphonate-binding protein. The deduced amino acid sequence of the *X. citri* SsuA protein shared 59% identity with the *E. coli* orthologue, and the *X. citri* SsuA gene was chosen for subsequent cloning, expression and purification of a recombinant form of the protein.

Interaction of recombinant *X. citri* SsuA with various alkanesulphonate substrates

The recombinant *X. citri* SsuA protein was expressed as a soluble cytosolic protein genetically fused with a histidine tag and a thrombin cleavage site at the N-terminal end. Maximum soluble protein yields (~80 mg/L) were achieved after expression under optimum inducing conditions. The protein was purified by single-step affinity chromatography and subsequently cleaved with thrombin to remove the vector-encoded histidine (Figure 2). The purified recombinant protein remained soluble and stable at high concentrations (6–12 mg/mL) even after extended storage at –20°C. Thermal shift experiments showed increased stability of recombinant *X. citri* SsuA in the presence of MOPS, MES, CHES, or HEPES but not in the presence of taurine, sulphate, thiosulphate or hydroxylamine (Figure 3A). These results indicate that the recombinant protein binds specifically to alkanesulphonate ligands. The *T_m* of SsuA varied from 39.5°C for the unbound form to 43.5°C (CHES), 45.8°C (HEPES), 47.1°C (MES) and 51°C (MOPS) for the putative ligand-bound forms. CD and fluorescence analyses showed that the recombinant SsuA was stable at pH values of 5, 7 and 9 (Figure 3B and 3C) and that it undergoes small changes in secondary structure content upon ligand binding (Figure 3D and 3E). The quenching of fluorescence observed after the addition of alkanesulphonates corroborated the CD results and suggested the possible presence of tryptophan residues close to the ligand-binding pocket (Figure 3E). Taken together, these results show that recombinant SsuA undergoes conformational changes on binding to alkanesulphonates.

The structure of ligand-bound *X. citri* SsuA

SsuA crystallised under a variety of conditions in which ammonium sulphate and alkanesulphonates (HEPES and MES) were present (Table S1). Initial crystallisation trials of the ligand-bound form of recombinant SsuA resulted in needle-like crystals that grew after one week in the presence of ammonium sulphate, MES and PEG. Refinement of these conditions produced better crystals in the absence of PEG and the presence of sodium chloride. The best diffraction patterns (1.7 and 1.9 Å) were obtained from crystals grown in 0.1 M NaCl, 1.6 M ammonium

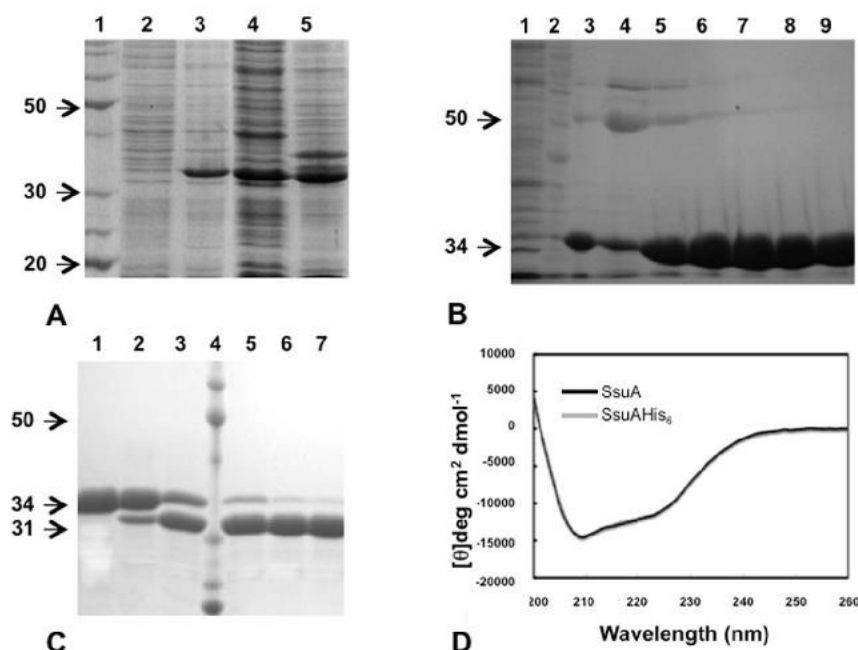


Figure 2. Expression and purification of recombinant *X. citri* SsuA. Production of the folded purified alkanesulphonate-binding protein SsuA of *X. citri*. (A) SsuA expression from *E. coli* BL21(DE3) cells. Lanes: 1) molecular weight markers; 2) whole cell extract of the non-induced strain; 3) whole cell extracts of the strain after induction with IPTG for 2 h; 4) soluble fraction of the whole cell extract of the induced strain; 5) insoluble fraction of the whole cell extract of the induced strain. (B) Purification of SsuA by immobilized metal affinity chromatography. Lanes: 1) Flow through; 2) molecular weight markers; 3–4) Washing steps with 20 mM imidazol; 5–9) elution fractions using 50 mM to 500 mM imidazol. (C) Cleavage of recombinant SsuA with thrombin for cut-off of the His₆tag. Lanes: 1) no treated SsuA; 2–3) SsuA incubated with thrombin for 1 and 2 h, respectively; 3) molecular weight markers; 4–6) SsuA digests after incubation for 4, 8 and 16 h, respectively. (D) Circular dichroism spectra of the SsuA with and without the His₆tag.

doi:10.1371/journal.pone.0080083.g002

The SsuA ligand-binding pocket and interactions with alkanesulphonates

The crystal structure of SsuA bound to each of the three different alkanesulphonates tested showed that ligand binding is stabilised primarily through a range of polar interactions between the sulphonic acid oxygen atoms and the NH groups of main-chain peptide hydrogen bonds (Gly⁶⁸, Gly⁸⁶, Ser¹⁴¹), one side chain NH group of Gln³⁶ and one hydroxyl group of Ser¹⁴¹ (Figure 5A and Table S2). Water molecules are responsible for the stability of the alkane chains. Residues in the pocket that interacts with the alkanesulphonates are highly conserved among orthologues from phytopathogens, plant-associated and soil bacteria, and enterobacteria (Figure 5B). Some residues exclusively found in *X. citri* SsuA confer a more apolar local environment than that observed in the other bacterial orthologues (Figure 5B, green colour).

The SsuA ligand-binding pocket has a volume of $1635 \pm 26 \text{ \AA}^3$ and an area of $2951 \pm 12 \text{ \AA}^2$, but only 14% of the volume is occupied by the ligand molecule (Figure 5C). The large binding pocket and the participation of at least 12 hydrophobic residues in forming this site reveal an adaptation that could explain the binding of a rather wide range of alkanesulphonate molecules of different sizes and shapes by this protein. Corroborating the intrinsic fluorescence data, W¹⁸⁵ faced the binding pocket, stabilising the alkane chain. Interestingly, all of the residues responsible for coordination of the sulphate (Gln³⁶, Gly^{68/86} and Ser¹⁴¹) belong to two helices and one strand ($\alpha 2$, $\alpha 5$ and $\beta 3$) (Figure 5C, in green); together, these residues define a positively charged cluster (Figure 5D). A similar structural organisation is found in other periplasmic ion-binding proteins such as the *E. coli*

aliphatic sulphonate-binding protein, the *Synechocystis* sp nitrate-binding protein, the *E. coli* phosphate-binding protein, the *Thermus thermophilus* glutamate/glutamine-binding protein and the *X. citri* molybdate-binding protein (Figure 5E).

Functional roles of *X. citri* SsuA

To evaluate the physiological role of SsuA during in vitro and in vivo growth of *X. citri*, a *ssuA* knockout strain (*Xac::ssuA*) was generated by site-specific mutagenesis (Figure 6A and B). A complementary strain (*Xac::ssuAc*) was generated by transformation of *Xac::ssuA* with the pKX33-*ssuA* vector, which encoded the full length *ssuA* gene under control of the native *ssu* promoter, giving rise to the *Xac::ssuAc* strain (Figure 6C). The isogenic *X. citri* *ssuA*-deleted strain was unable to grow in minimal medium containing alkanesulphonates (HEPES, MOPS, or MES) as the sole sulphur source but grew well in the presence of sulphate (Figures 7A and 7B). This result indicated that the *ssu* operon is functional and is required for alkanesulphonate uptake in *X. citri*. In addition, the *Xac::ssuA* mutant formed small bright yellow colonies after growth in LB plates for 24 h (Figure 7C). In both situations the altered phenotypes were reverted in the *Xac::ssuAc* strain (Figure 7C). The altered colony morphology of the *Xac::ssuA* strain suggests a decrease in xanthan gum production, a feature previously observed by other groups [14,15,16]. Indeed, we determined that xanthan gum production by the *Xac::ssuA* strain during growth in LB medium was at least three-fold lower than that of the parental strain (Figure 7D). Complementation with the pKX33-*ssuA* restored in a great extent production the colony morphology and production of xanthan gum by the *Xac::ssuA* strain (Figure 7D). To evaluate the effects of alkanesulphonate uptake on the

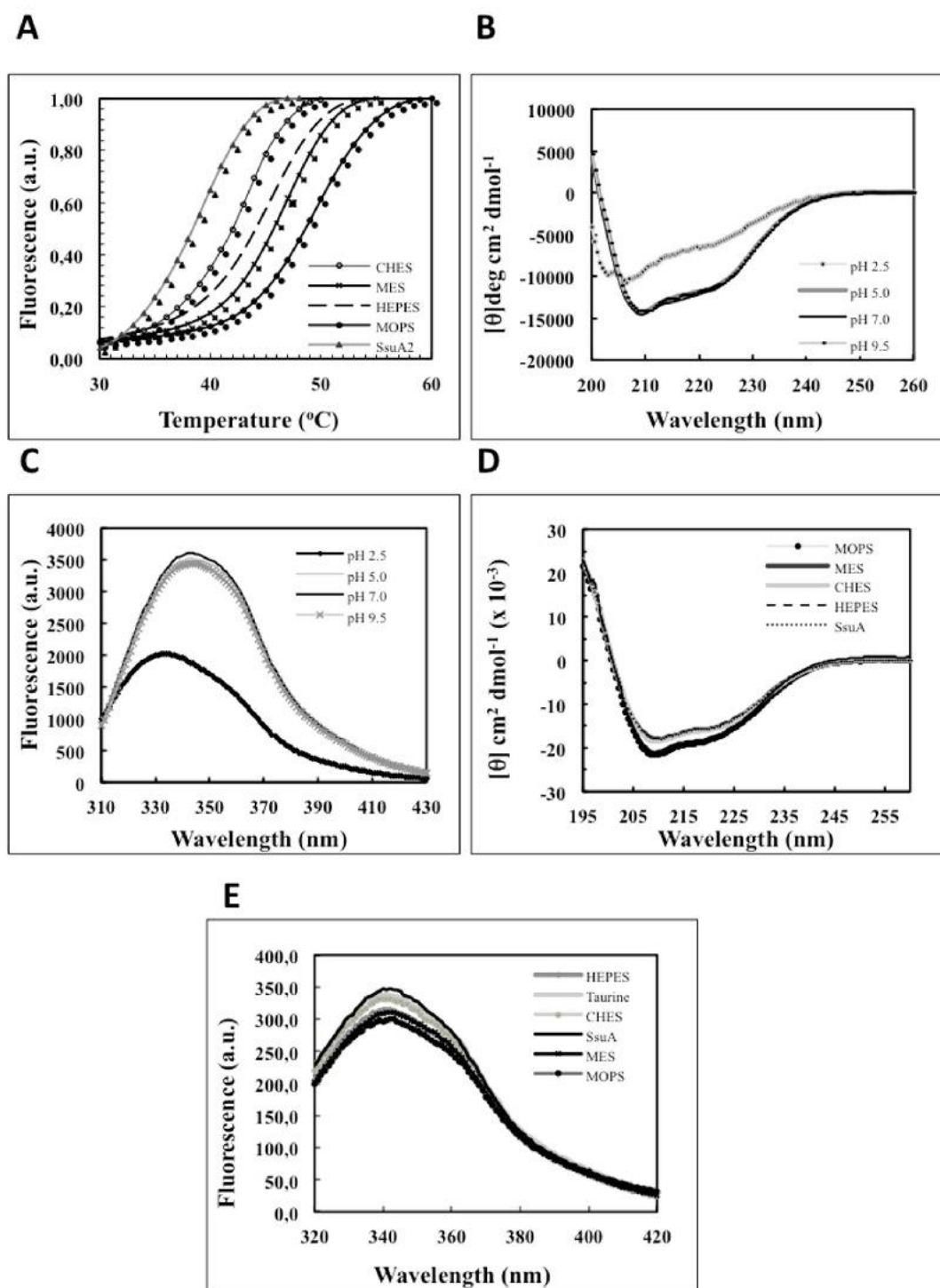


Figure 3. Spectroscopic analysis of *X. citri* SsuA protein in the presence of alkanesulphonates and at different pH values. (A) Thermal shift assay in the presence of various alkanesulphonates (CHES, MOPS, MES, or HEPES). (B) Circular dichroism and (C) fluorescence analyses of the recombinant protein at different pH values. (D) Circular dichroism and (E) intrinsic fluorescence of the recombinant *X. citri* SsuA in the presence of ligands. The stability of the protein at various pH values and in the presence of various aliphatic sulphonates was monitored by following the intrinsic fluorescence of the tryptophan residues using an Aminco BOWMAN series 2 spectrofluorometer.
doi:10.1371/journal.pone.0080083.g003

pathogenicity of *X. citri*, we monitored the behaviour of the wild-type, the *Xac::ssuA* and *Xac::ssuAc* strains after in vivo inoculation into a susceptible citrus host (*C. sinensis*). As shown in **Figure 8A**, the *Xac::ssuA* strain showed defective growth in leaf

tissues 6 days after inoculation in comparison with the parental and complemented strains. In addition, the leaf lesions formed by the *Xac::ssuA* strain were smaller than those formed by the parental strain (data not shown). Leaves infected with the *X. citri* 306 strain

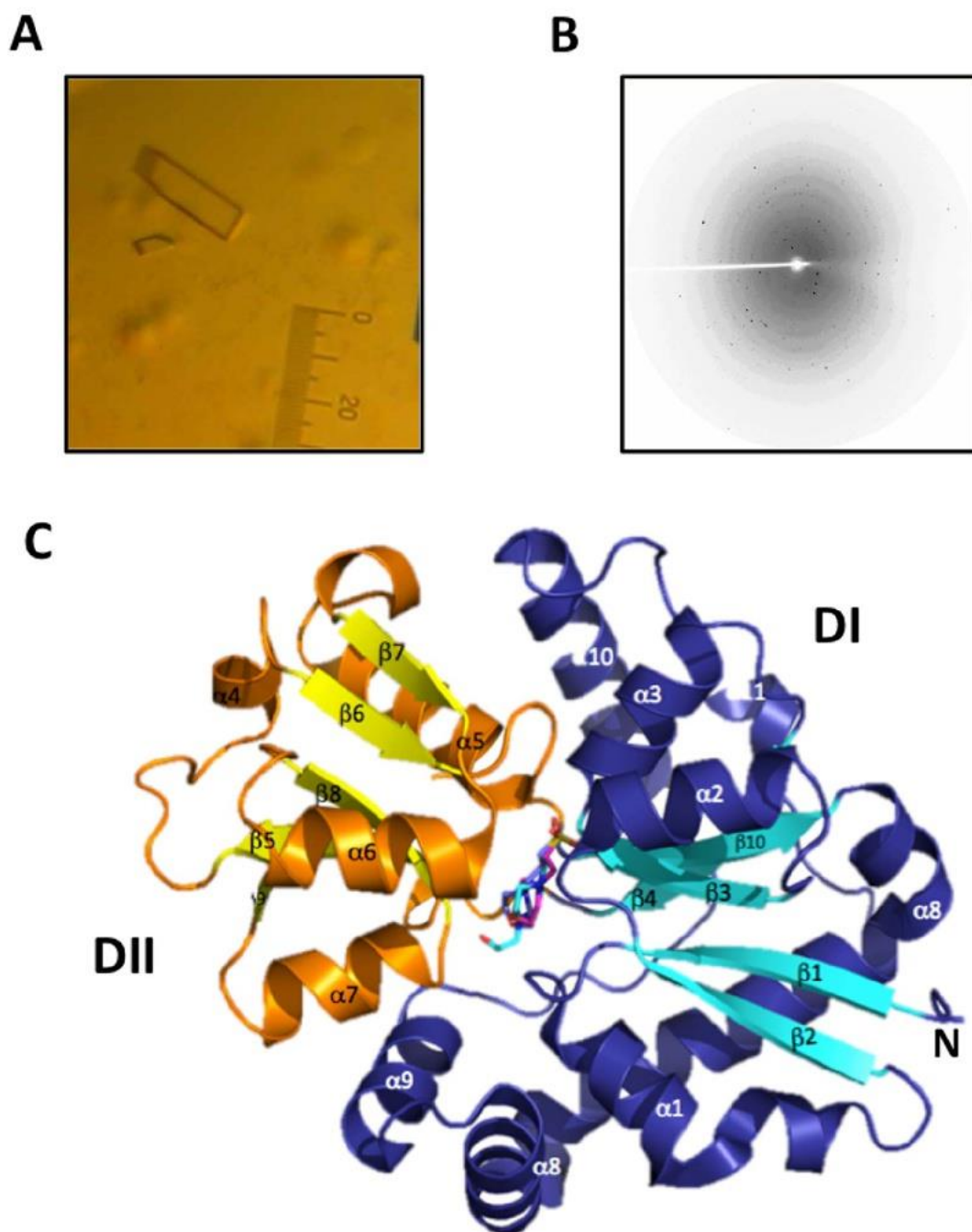


Figure 4. Crystallisation, X-ray diffraction pattern and determination of the tertiary structure of *X. citri* SsuA. (A) SsuA crystals grown in 0.1 M HEPES, pH 7.3, 1.5 M ammonium sulphate and 0.1 M NaCl using 6 mg/ml of protein in 20 mM Tris buffer, pH 7.0, containing 50 mM NaCl. (B) Diffraction pattern of SsuA crystal at 2.0 Å resolution. Data were collected at the D03B-MX1 beam line Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) using 1.433 Å radiation and recorded on a MARCCD165 detector (oscillation data with $\Delta\phi = 1.0^\circ$). (C) Cartoon illustration of the overall structure of SsuA bound to HEPES, MOPS and MES (stick) showing the alpha-beta structures of domains I (deep blue and cyan) and II (orange and yellow). The N-terminus is shown in domain I.
doi:10.1371/journal.pone.0080083.g004

showed typical blister-like lesions characteristic of the hyperplasia and the water-soaking phenotypes (**Figure 8B, I to III**). Complementation of the *Xac::ssuA* with pKX33-*pssuA* restored the canker lesions symptoms to the wild-type levels (**Figure 8B, IV to VI**). In contrast, much reduced lesions were observed in leaves inoculated with the *Xac::ssuA* strain, and the lesions that formed were not blister-like (**Figure 8B, VII to IX**). Collectively, these results indicate that the alkanesulphonate uptake

system also affects the in vivo behaviour of *X. citri* in *C. sinensis* plants.

Discussion

Although sulphonates and sulphur-containing organic compounds represent the most abundant sulphur source in most soils, there are no data regarding the role of alkanesulphonate uptake in

Table 1. Data processing statistics of the *X. citri* SsuA crystals and refinement data from its structures.

Crystal	Native SsuA+HEPES	NaI derivative	CsCl ₃ derivative	SsuA+MOPS	SsuA+MES
<i>X-ray diffraction data</i>					
Wavelength (Å)	1.433	1.433	1.433	1.46	1.46
Space group	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Unit cell parameters	a = 30.66	a = 30.68	a = 30.68	a = 30.98	a = 30.87
	b = 85.50	b = 85.18	b = 85.18	b = 86.21	b = 86.36
	c = 46.83	c = 46.89	c = 46.90	c = 46.73	c = 46.45
	α = 90.00	α = 90.00	α = 90.00	α = 90.00	α = 90.00
	β = 98.08	β = 98.20	β = 98.20	β = 97.76	β = 97.46
	γ = 90.00	γ = 90.00	γ = 90.00	γ = 90.00	γ = 90.00
Resolution range (Å)	30.00–2.00	30.00–2.30	30.00–2.38	26.00–1.70	26.00–1.99
Rsym (%)	0.062 (0.162)	0.062 (0.162)	0.062 (0.162)	0.09 (0.23)	0.11(0.40)
Completeness (%)	99.3 (99.7)	97.9 (95.7)	98.0 (94.7)	97.9(95.7)	95.1(80.5)
Redundancy	4.3	4.0	4.0	5.8	3.4
<I/σ>	23.88 (7.48)	13.98 (3.48)	14.18 (3.48)	18.3(3.0)	10.4(2.1)
Mosaicity (deg)	0.456	0.771	0.771	0.500	0.912
Wilson Plot B-factor (Å ²)	14.6			22.67	41.04
<i>Refinement and model quality</i>					
Resolution range (Å)	46.37 – 2.01			26.14–1.70	24.09–1.99
Number of reflections: work/test	15046			21275	14798
Rvalue (%)	0.145			0.162	0.184
Rfree (%)	0.220			0.213	0.256
Overall mean B-factor (Å ²)	13.96			21.0	38.02

Values in parenthesis correspond to data regarding the last resolution shell.

Footnote: ^a R-factor = $\sum |F_o(h) - F_c(h)| / \sum F_o(h)$, where $F_o(h)$ and $F_c(h)$ are observed and calculated amplitudes for reflection h . R-free is calculated by the same equation using 5 % of the data, chosen randomly and omitted from the refinement.

doi:10.1371/journal.pone.0080083.t001

the behaviour of plant pathogens, particularly those belonging to the *Xanthomonas* genus. In this work, we showed that a complete set of genes required for the uptake and metabolism of alkanesulphonates is found in the genomes of *X. citri* and *X. fuscans*, two closely related citrus pathogens. We expressed and purified a recombinant form of *X. citri* SsuA that specifically binds to various alkanesulphonates but not to sulphate, sulphate esters or a number of other sulphur-containing compounds. Using the recombinant protein, we solved for the first time the three-dimensional structure of a bacterial SsuA protein bound to three different alkanesulphonates (MES, HEPES and MOS). Determination of the crystal structure of the protein permitted the identification of the SsuA protein domains that interact with alkanesulphonate ligands and of the amino acid residues that coordinate these ligands within the ligand-binding pocket of the protein. The rather large binding pocket and the presence of several water molecules clearly accounts for how *X. citri* SsuA accommodates different alkanesulphonates molecules. Finally, we presented evidence that the Ssu system is functional in the *X. citri* 306 strain. Using an isogenic mutant carrying a knockout copy of the *ssuA* gene generated using gene replacement techniques we showed that the Ssu system affects both the in vitro and in vivo behaviour of the strain. In addition, complementation of the *ssuA* mutant strain with a plasmid encoding the wild type gene corrected the altered in vitro and in vivo phenotypes including the capability of the strain to induce disease symptoms in a susceptible citrus host. The present study offers new and relevant information regarding the structural and functional aspects of the alkanesulphonate uptake system of *X.*

citri and raises interesting questions regarding the metabolism of alkanesulphonates in the physiology and pathogenicity of this economically relevant phytopathogen.

The search for *ssu* genes homologous to those found in *E. coli* and other bacterial species revealed that, in the *Xanthomonas* genus, only *X. citri*, *X. fuscans*, *X. campestris* pv. *musacearum* and *X. gardneri* carry a complete set of *ssu* genes including the ABC transporter and enzymes involved in sulphonate desulphurisation (*ssuD* and *ssuE*). This finding contrasts with the widespread occurrence of functional genes involved with the uptake and metabolism of alkanesulphonates in many bacterial genera such as *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Shingomonas* and *Nostoc*; these bacteria are present in soil and live in environments in which sulphate esters and carbon-bonded sulphur (sulphonates or amino acid sulphur) represent most of the available sulphur [17,1]. The paucity of *ssu* genes in *Xanthomonas* species suggests that these genes have been recently acquired in the evolutionary history of the genus, most likely by a horizontal gene transfer event. This finding also raises questions about the role of alkanesulphonate uptake in the physiology of the species in which these genes are found.

The remainder of our study focused on the investigation of the Ssu uptake system in *X. citri*, the most economically relevant citrus pathogen. For that purpose, we determined the crystal structure and characterised the physiological role of the SsuA protein, the periplasmic component that confers specificity and affinity to the uptake system [1]. As a first step, we generated a recombinant form of *X. citri* SsuA that retained alkanesulphonate-binding properties similar to those expected for the native protein. As

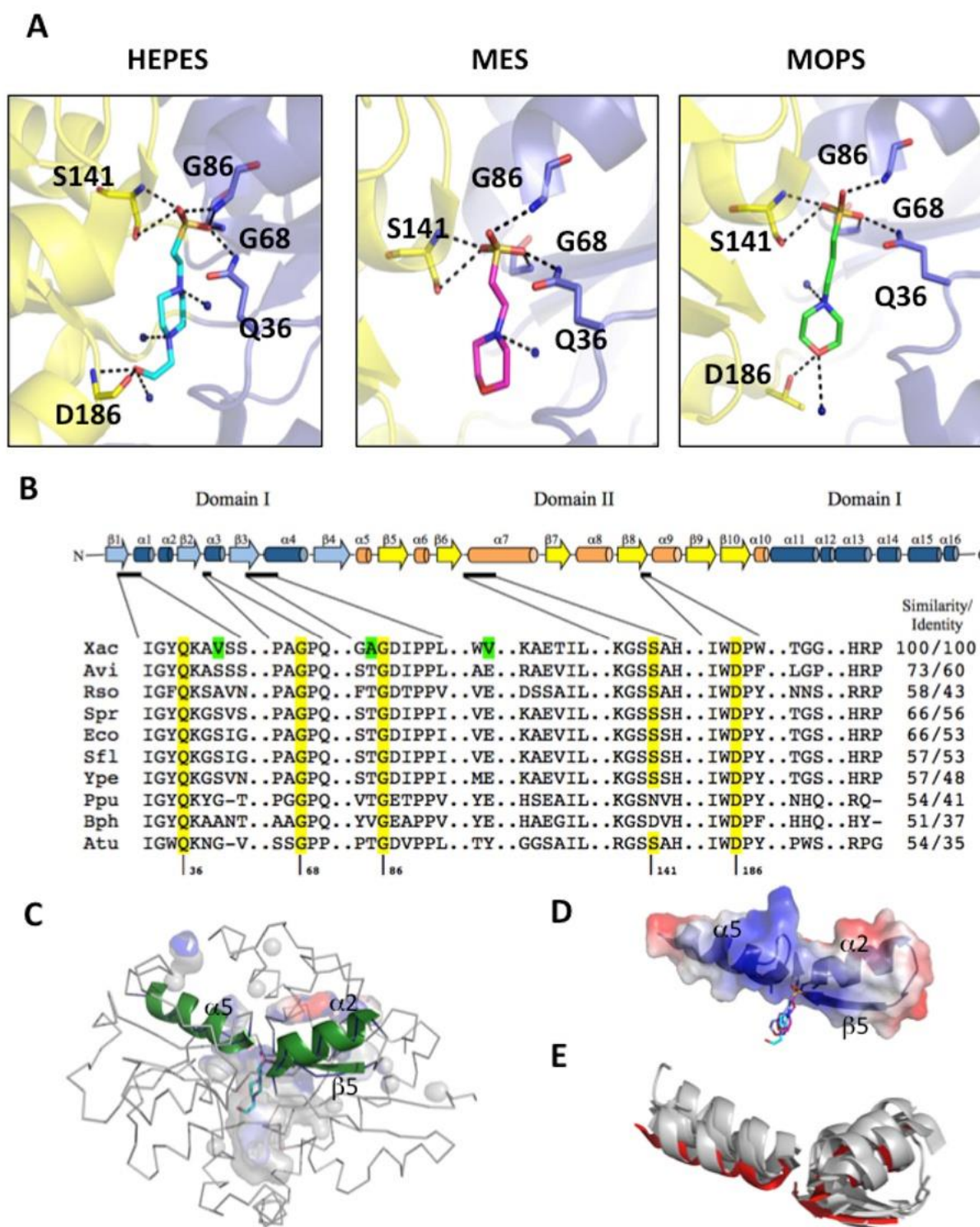


Figure 5. Ligand-binding site and interactions of the *X. citri* SsuA protein. (A) Ligand interactions of SsuA and HEPES, MES and MOPS. Domains I and II are coloured in blue and yellow, respectively; the residues involved in the ligand interaction, as well as the ligands themselves, are shown as sticks. (B) SsuA topology and conservation of the ligand-binding sites in different orthologues. The residues that form the pocket and those that interact with ligands are marked in clear and dark grey, respectively. The residues marked in green are unique to *X. citri* SsuA. The numbering follows the *X. citri* SsuA sequence. Xac: *X. citri* (GI: 21243924); Avi: *Azotobacter vinelandii* (GI: 67153714); Spr: *Serratia proteomaculans* (GI: 5604713); Eco: *E. coli* (GI: 90111189); Sfl: *Shigella flexneri* (GI: 161486517); Ype: *Yersinia pestis* (GI: 22124165); Rso: *Ralstonia solanaraceum* (GI: 207723295); Ppu: *Pseudomonas putida* (GI: 167031279); Bph: *Burkholderia phytofirmans* (GI: 187921640); and Atu: *Agrobacterium tumefaciens* (GI: 159184964). (C) Structure of SsuA in ribbon diagram showing the positioning of the two helices and the beta-sheet (forest cartoon) that form the dipole. The ligand-binding pocket and HEPES inside are shown, respectively, in transparent surface and stick. (D) Electrostatic potential at the surface of the two helices ($\alpha 2$ and $\alpha 5$) and the beta-strand ($\beta 3$) that contain the residues for dipole formation and sulphate group coordination. (E) Structural superposition of secondary structures of periplasmic-binding proteins (grey) with dipoles similar to that found in the SsuA structure (shown in red). The superposed

helices and β -strands belong to the *E. coli* aliphatic sulphonate-binding protein (PDB 2X26), *Synechocystis* sp. 6856 nitrate-binding protein (PDB 2G29), *E. coli* phosphate-binding protein (PDB 1IXH), *Thermus thermophilus* glutamate/glutamine-binding protein (PDB 1U55) and *X. citri* molybdate-binding protein (PDB 2H5Y).
doi:10.1371/journal.pone.0080083.g005

experimentally demonstrated, the recombinant protein exhibited changes in secondary structure and increased thermal stability after specific binding to MOPS, MES, CHES and HEPES but not after exposure to taurine, sulphate, thiosulphate or hydroxylamine. These results indicate that the *X. citri* Ssu system is apparently specific for alkanesulphonates, as previously reported for Ssu orthologues found in *P. putida*, *E. coli* and *B. subtilis* [18,7,6].

Previous description of the crystal structure of Ssu components has been restricted to the unbound form of *E. coli* SsuA [8]. The availability of large amounts of recombinant *X. citri* SsuA capable of binding to various alkanesulphonates permitted us to solve for the first time the crystal structure of a bacterial SsuA protein in complex with HEPES, MOPS and MES. The size of the ligand cavity and the presence of 12 hydrophobic residues within it reveal an adaptation of the SsuA protein for interaction with long-chain alkane groups. Similarly relevant is the presence of water molecules in the binding pocket, which may offer flexibility to accommodate the ligands. In agreement with the results of spectroscopic assays, the crystal structure results indicate that

SsuA-ligand interactions involve conformational changes associated with movement of the protein domains. According to the three-dimensional structure of SsuA, W¹⁸⁵ is the most probable residue involved in the observed quenching of fluorescence after ligand binding because it is in close contact with the bound alkanesulphonate and stabilises the aromatic ring of the apolar chains of the molecule. The higher thermal stability evidenced when SsuA is bound to MOPS is due to the presence of shorter hydrogen bonds with the residues belonging to the dipole. Indeed, we showed that alkanesulphonate stabilisation of SsuA is centred in residues that are conserved in different SsuA orthologues, primarily those that form a positive dipole that specifically attracts and interacts with the sulphate group of the alkanesulphonate molecule [19–21]. The mechanism of binding and the very positive electrostatic potential of the entrance of the binding pocket suggest that the ligand is attracted to the protein by the sulphate group and then stabilised inside the pocket by the water molecules and the apolar environment. The *X. citri* SsuA structure reported here represents the first report of a bacterial SsuA orthologue bound to different

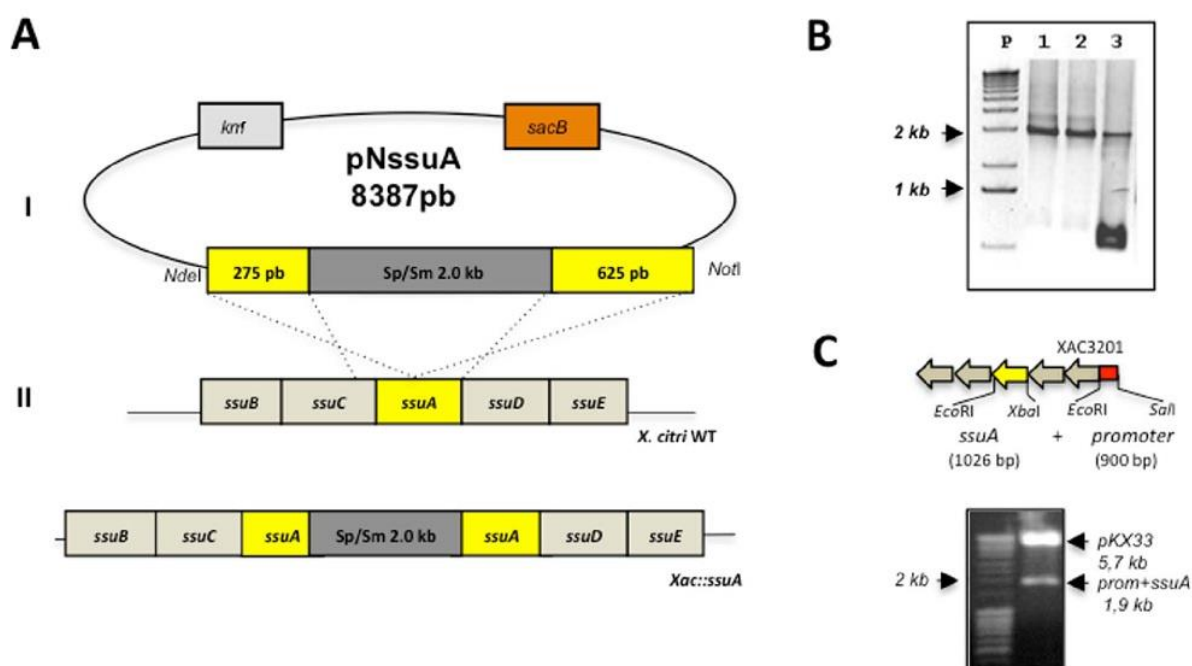


Figure 6. Construction of the *X. citri* *ssuA*-deleted mutant (*Xac::ssuA*) and complemented strain (*Xac::ssuAc*). (A) Chromosomal deletion of the *ssuA* gene was obtained after electroporation of the suicide pNssuA plasmid into the *X. citri* 306 strain. (I) The first step in the construction of the *X. citri* mutant was the insertion of a 2-kb fragment encoding resistance to spectinomycin and streptomycin into the *KpnI* site of the *ssuA* gene, originating within the pNssuA (8,152 bp) vector. (II) After transformation of wild-type *X. citri* with pNssuA, a double recombination event generated the *Xac::ssuA* mutant strain (III), which was screened by selection of cells resistant to both spectinomycin and sucrose. (B) PCR amplification of *ssuA* genes of selected *X. citri* colonies using primers FssuA2Nde28a and RssuA2Hind28a. Samples: P, molecular weight markers; 1–3, colonies selected for resistance to spectinomycin and sucrose. The presence of a single 2-kb band indicates a successful gene replacement event (samples 1 and 2), while amplification of two bands of 1 kb and 2 kb in size indicates the presence of the chromosomal wild-type gene and a copy of the mutated *ssuA* gene (sample 3). (C) Strategy of cloning and digestion analysis of the pKX33-*ssuA* plasmid. The localization of *ssuA* gene and the promoter region in the *ssu* operon are evidenced in yellow and red colours, respectively. A band of 1,926 bp was generated after cleavage of the pKX33-*ssuA* plasmid with *SacI* and *XbaI* restriction enzymes.
doi:10.1371/journal.pone.0080083.g006

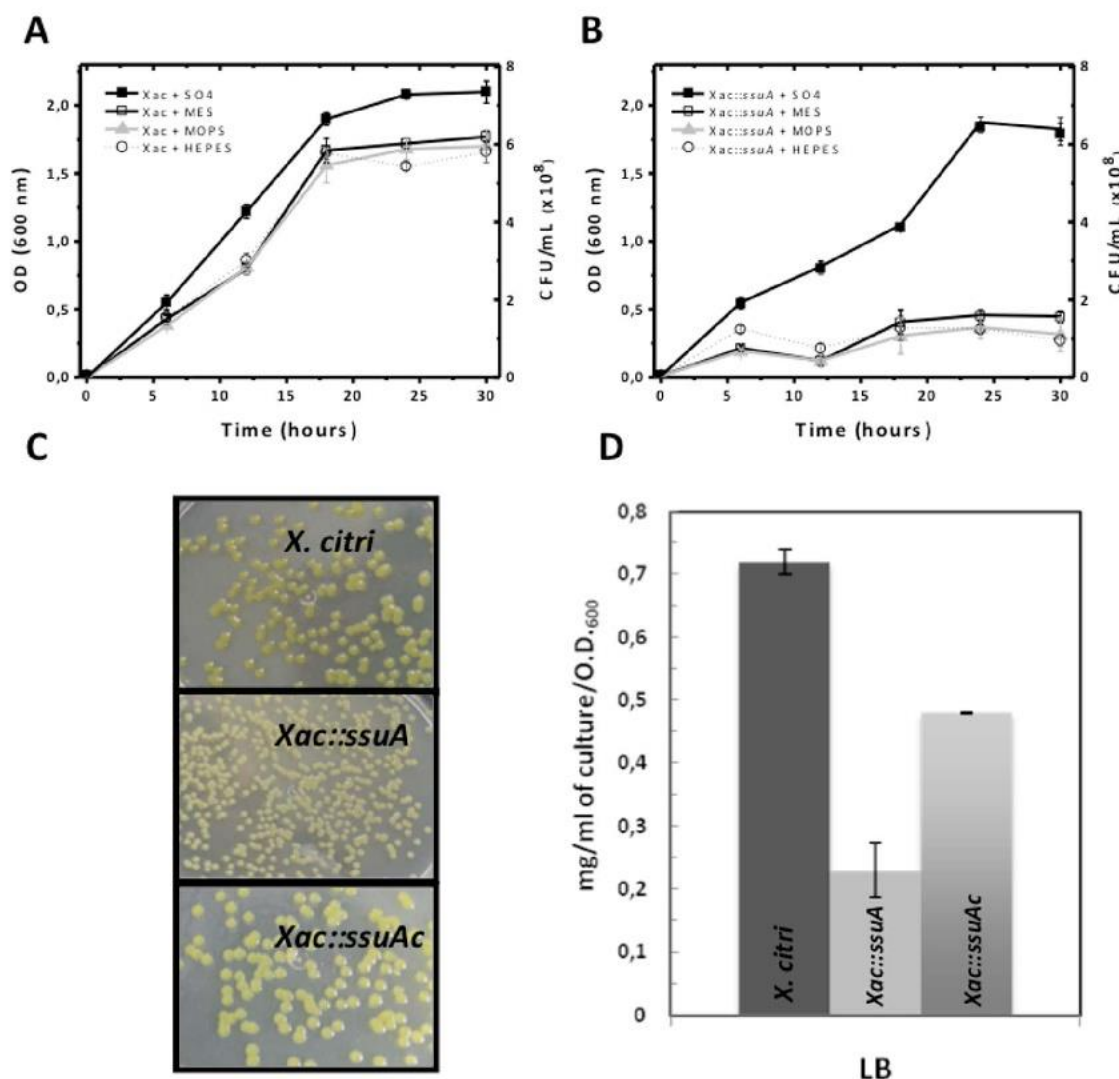


Figure 7. Lack of SsuA affects *in vitro* growth and xanthan gum production by *X. citri*. Growth curve of *X. citri* wild type (A) and the *Xac::ssuA* mutant (B) in M9 media supplemented with sulphate or different alkanesulphonate sources. Samples were taken every 2 h for measuring the growth of the samples. (C) The *Xac::ssuA* mutant shows altered colony morphology after growth at 30°C in LB plates. The strain recovered the normal colony morphology after complementation with the *ssuA* gene. (D) Production of xanthan gum by the parental and *ssuA* mutant strain after 24 h of growth in LB broth. Complementation with pKX33-*ssuA* restored the reduced xanthan gum production observed in the *Xac::ssuA* mutant. doi:10.1371/journal.pone.0080083.g007

alkanesulphonates and provides a reference for future studies of alkanesulphonate ABC transporters in different bacterial species.

The results obtained *in vitro* showed that a bacterial strain carrying an inactive copy of the *ssuA* gene failed to grow in the presence of alkanesulphonates such as HEPES, MOPS and MES under inorganic sulphate starvation conditions. This observation indicates that alkanesulphonate uptake is active in *X. citri* and that it may be required under environmental conditions in which the availability of inorganic sulphate is restricted. Xenobiotic and naturally occurring sulphonates, including taurine, isethionate, cysteic acid, methanesulphonate, and several undefined sulphonates, make up a large part of the sulphur present in soil humus and marine sediments [2,17]. In plants, in addition to sulphonolipids found in thylakoid membranes, a variety of S-containing secondary metabolites that often play important roles in defence against pathogens are synthesised [22]. Our results demonstrated that disruption of the *ssuA* gene resulted in an attenuated

phenotype following infection of a susceptible citrus host (*C. sinensis*). This phenotype was attributable at least in part to the reduced production of xanthan gum, which is required for the water soaking phenotype and for the plant's resistance to various forms of environmental stress [23,24,25]. The biosynthesis of xanthan gum involves the coordinate expression of 12 genes that are part of the *gumB-gumM* operon [25,26]. Twelve of these genes encode proteins with 4 or more cysteine residues. A reduction in the sulphur supply after disruption of the *ssuA* gene may have affected the synthesis of cysteine-enriched proteins and, thus, indirectly reduced xanthan gum production.

Although the precise role of alkanesulphonates during the *in vivo* growth of *X. citri* is not presently known, our results indicate that alkanesulphonates may have a previously unsuspected relevance to plant-bacterial interactions. Future studies directed at achieving a better understanding of the nutritional and physiological roles of alkanesulphonates in *X. citri* are warranted.

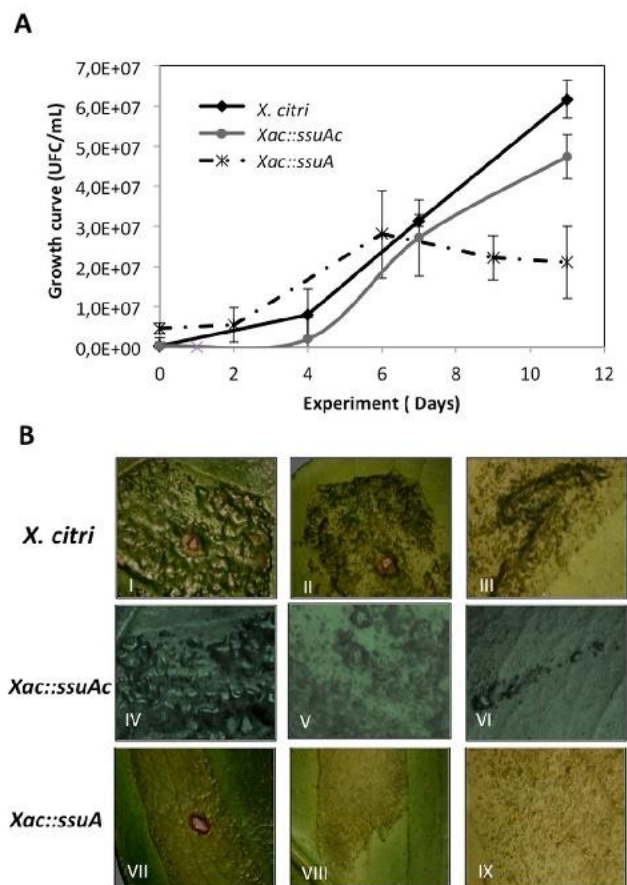


Figure 8. Altered in vivo growth behaviour and leaf lesion formation by the *X. citri* *ssuA* mutant in the *C. sinensis* plant host. (A) Growth curves of *X. citri* wild-type, the isogenic *Xac::ssuA* mutant and the complementary strain (*Xac::ssuAc*) on leaves of *C. sinensis* (susceptible sweet orange cultivar Baía) during an 11-day period after inoculation of 7×10^6 CFU. The data represent the means of three independently performed experiments. (B) A detailed view of the canker pustules and leaf lesions 14 days after infection. Photographs of the upper surfaces (I, IV and VII) and the undersides (II, V and VIII) of the leaves were taken and enlarged 20- or 30-fold (III, VI and IX), respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0080083.g008

Methods

Bacterial strains, plasmids and culture conditions

The *X. citri* 306 strain and the *E. coli* DH5 α and BL21 strains were grown in LB medium [27] at 30°C and 37°C, respectively. The *X. citri* 306 strain, the isogenic *ssuA*-knockout mutant and complemented strain *Xac::ssuAc* were also grown in M9 minimal medium [27] and sulphate-free M9 minimal medium supplemented with sulphate or alkanesulphonates as described in the Results section at 28°C under aerobic conditions. When required, kanamycin (25 or 50 μ g/ml), spectinomycin (50 μ g/ml), and/or ampicillin (100 μ g/ml) were added to selective media.

Sequence analyses. The amino acid and corresponding nucleotide sequences of the *X. citri* *ssuA* gene (gi|21243924|ref|NP_643506.1) as well as the *ssuA* orthologue sequences used in this work were obtained from the National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The *Xanthomonas* species phylogeny tree was based on the 16S RNA processing protein RimM accession numbers: *X. axonopodis* pv. *citri* str. 306 (gi: 21107448), *X. campestris* pv. *vesicatoria* str. 85-10 (gi: 78035329), *X.*

translucens pv. *graminis* ART-Xtg29 (gi: 424790967), *X. campestris* pv. *campestris* str. ATCC 33913 (gi: 21112243), *X. campestris* pv. *musacearum* NCPPB 4381 (gi: 289670358), *X. axonopodis* pv. *citrimelo* F1 (gi: 346724183), *X. sacchari* NCPPB 4393 (gi: 380511630), *X. albilineans* GPE PC73 (gi: 285017747), *X. perforans* 91-118 (gi: 325924837), *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* str. ICPB 11122 (gi: 294626998), *X. gardneri* ATCC 19865 (gi: 325919892), and *E. coli* serotype O157:H7 (gi: 209157890). The proteins that shared high sequence identity with the components of the Ssu transporter are the following: *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* nitrate transport protein (ZP_06732183), *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* aliphatic sulphonates ATP-binding protein (ZP_06732181), *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* ABC transporter permease (ZP_06703616), *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*, *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* oxidoreductase (ZP_06703614), *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* nitrilotriacetate monooxygenase component A (ZP_06703613.1), *X. campestris* pv. *musacearum* alkanesulphonate transporter substrate-binding (ZP_06488164.1), *X. campestris* pv. *musacearum* ABC transporter ATP-binding subunit (ZP_06488166.1), *X. campestris* pv. *musacearum* ABC transporter permease (ZP_06488165), *X. campestris* pv. *musacearum* oxidoreductase (ZP_06488163.1), *X. campestris* pv. *musacearum* nitrilotriacetate monooxygenase component A (ZP_06488162.1), *X. gardneri* aliphatic sulphonates binding protein (ZP_08184321.1), *X. gardneri* nitrate/sulphonate/bicarbonate ATPase (ZP_08184859.1), *X. gardneri* nitrate/sulphonate/bicarbonate permease (ZP_08184860.1), *X. gardneri* oxidoreductase (ZP_08184320.1), and *X. gardneri* flavin-dependent oxidoreductase (ZP_08184319). Sequence alignments were performed using ClustalW2 [28] at the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/>). The phylogenetic tree was accessed by the neighbour-joining method [29], and bootstrap values were obtained from 1,000 duplicates using the MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) package, version 5 [30]. Coordinates and structure factors were deposited in the RCSB Protein Data Bank with PDB codes 3E4R (SsuA + HEPES), 3KSX (SsuA + MOPS) and 3KSJ (SsuA + MES).

Cloning of the gene encoding *X. citri* SsuA protein. All gene cloning steps were carried out with the *E. coli* DH5 α strain; expression of the recombinant SsuA protein was carried out with the *E. coli* BL21 (DE3) strain (Novagen). The DNA fragment with the *X. citri* *ssuA* gene sequence, encoding the mature protein without the first 126 base pairs (42 amino acids) corresponding to the signal peptide, was amplified by PCR (forward primer 5' gCgCATATggCCgAgCCgCgCA 3'; reverse primer 5' gCgAAgCTTTCATTTCCTCAC 3') with Platinum High Fidelity Taq polymerase (Invitrogen) under standard amplification conditions. The amplicon, corresponding to 972 base pairs, was cloned into the vector pGEM T-Easy (Promega) and subcloned into the vector pET28a (Novagen) for expression in *E. coli* BL21 (DE3).

Expression and purification of recombinant *X. citri* SsuA. Cultures of the recombinant *E. coli* BL21 (DE3) strain transformed with pETSsuA were prepared aerobically in LB medium supplemented with 50 μ g/mL kanamycin until mid-log phase (OD_{600} 0.5–0.6); IPTG was then added to a final concentration of 0.1 mM. The cultures were induced aerobically (200 rpm) for 2.5 h at 28°C. Cells were collected by centrifugation at 8,000 g for 15 min at 4°C and stored at –20°C for approximately 16 h before lysis. The cell pellets were suspended in buffer 1 (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, containing 100 mM NaCl, 5% glycerol and 20 mM imidazole) and incubated with lysozyme (final concentration of 100 μ g/mL) and PMSF (1 mM) for 1 h in an ice bath. The cells were sonically disrupted in a Branson Digital Sonifier (Model 450), and soluble fractions were separated from the non-soluble material by centrifugation at

16,000 g for 30 min at 4°C. The recombinant SsuA protein was purified from the soluble fraction by immobilised metal affinity chromatography using a HisTrapHP column (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. The charged resin was washed with buffer 1 (30 bed volumes) followed by step gradient elution with buffers containing increasing concentrations of imidazole (50–500 mM). The eluted fractions were dialysed once against 20 mM Tris-HCl at pH 7 containing 50 mM NaCl and concentrated with Ultrafree MWCO 10,000 centrifugal filters (Amicon Millipore) to a final concentration of 6 mg/mL. The eluted fractions were analysed by SDS-PAGE using 12% acrylamide gels and stained with Coomassie Blue. Protein concentration was determined spectrophotometrically using the Edelhoch method [31]. Recombinant SsuA without the His6-tag was obtained by cleavage of the purified protein with thrombin (Sigma Aldrich, USA) at room temperature. Samples of 20 mg protein were incubated for 2 h with 10 units thrombin in 50 mM Tris, pH 7.5, 10 mM NaCl and 1 mM DTT.

Spectroscopic analyses of the recombinant SsuA protein. The stability of the protein in solution at various pH values (20 mM Tris, pH 7.0, 50 mM NaCl; 20 mM sodium acetate, pH 5.0, 50 mM NaCl; 20 mM sodium citrate, pH 3.0, 50 mM NaCl; 20 mM glycine, pH 10.0, 50 mM NaCl) and its behaviour in the presence of aliphatic sulphonates was monitored by following the intrinsic fluorescence of the tryptophan residues using an Aminco BOWMAN series 2 spectrofluorometer. The excitation and emission bandwidths were 4 and 8 nm, respectively. The fluorescence cell (1×1 cm) was mounted on a thermostatic holder. Tryptophan fluorescence was measured at an excitation wavelength of 295 nm, and emission spectra were recorded between 340 and 420 nm. All measurements were performed using 10 µM protein and 20 µM sulphonates in 20 mM Tris, pH 8.0. Circular dichroism measurements were carried out on a JASCO J-810 spectropolarimeter equipped with a Peltier-type temperature controller and a thermostatic cell holder interfaced with a thermostatic bath. Spectra were recorded in quartz cells with a 0.1 cm path length at a protein concentration of 10 µM in various buffers. Twenty consecutive scans were accumulated and averaged. The data were corrected for the baseline contribution of the buffer, and the observed ellipticity was converted into the mean residue ellipticity [θ] based on a mean residue molecular mass of 34,000 Da. Secondary structure was estimated from fitted Far-UV CD spectra using the DICROPROT software package [32]. Thermal shift assays were performed with the dye SYPRO orange and conducted in the iCycler iQ Real Time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA). The T_m represents the temperature at the midpoint of the unfolding transition. Various concentrations of protein, ligand and buffer were evaluated in 96-well iCycler iQ PCR plates for determination of the appropriate conditions for the assay. For the final experiments, solutions of 100 µl were prepared with 6 µM SsuA, 2.7X SYPRO orange, and 5 mM ligand in 20 mM Tris, pH 7.4, 50 mM NaCl. The plate was heated from 25°C to 85°C at a heating rate of 0.5°C/min. The fluorescence intensity was measured using excitation and emission wavelengths of 490 and 530 nm, respectively. Stock solutions of the alkanesulphonates tested were prepared at concentrations of 0.1 M and included HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulphonate] pH 7.0, MOPS (3-morpholinopropane-1-sulphonate) pH 6.9, MES [2-(*N*-morpholino)-ethanesulphonate] pH 4.5, CHES [2-(*N*-cyclohexylamino)-ethanesulphonate] pH 4.5, CAPS (N-cyclohexyl-3-aminopropanesulphonate) pH 4.5, PIPES [piperazine-*N*,*N*-bis(2-ethanesulphonate)], thiosulphate, pyridinium *p*-toluenesulphonate, 3-amino-1-propane sulphonate 97%, 3-hydroxyl-

amine-*O*-sulphonic acid, 3-hydroxypropane-1-sulphonic acid and taurine.

Crystallisation of the *X. citri* SsuA protein. Crystallisation conditions were screened using sparse-matrix screens in 96-well plates with protein at a concentration of 6 mg/ml in 20 mM Tris buffer, pH 7.0, containing 50 mM NaCl at 18°C. SsuA crystallisation was performed with the sitting-drop vapour-diffusion method by mixing equal volumes (3 µl) of protein solution and crystallisation solutions. Data from the first crystals obtained in HEPES were collected at 100 K at the D03B-MX1 beam line Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) [33] using 1.433 Å radiation and recorded on a MARCCD165 detector (oscillation data with $\Delta\phi = 1.0^\circ$). The crystals were cooled to 110 K in a stream of nitrogen gas to minimise radiation damage. Cryoprotection was obtained by soaking crystals into drops of crystal buffer plus 10% glycerol. Data collection was performed at 100 K at the D03B-MX2 beam line Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) using 1.6 Å radiation and recorded on a MARCCD325 detector (oscillation data with $\Delta\phi = 1.0^\circ$).

Structure solution, model building and refinement. Diffraction data were indexed using the XDS package [34] and processed using SCALA and TRUNCATE [35]. NaI and CsCl₃ derivative crystals were obtained by quick cryo-soaking for 15 s in a solution composed of the mother liquor supplemented with 0.5 M NaI or CsCl₃ and 20% glycerol, yielding a data resolution of 2.4 Å. The SsuA 3D structure was solved by multiple isomorphous replacement and anomalous scattering (MIRAS) using the NaI and CsCl₃ derivative datasets. The program AutoSHARP [36] was used to calculate the phases and to determine the incorporation of iodine and caesium chloride sites using SHELX [37] and density modification procedures. The ArpwArp [38] program was used to automatically build approximately 80% of the residues. Construction of the model was performed using COOT, and 14 cycles of refinement were realised using REFMAC [39]. The SsuA structure in the presence of MOPS and MES was obtained by molecular replacement using the structural coordinates of SsuA bound to HEPES (PDB code 3E4R).

Construction of the *Xac::ssuA* mutant. Site-specific inactivation of the *ssuA* gene was carried out with the *X. citri* 306 strain using a suicide plasmid carrying an inactivated copy of the *ssuA* gene for the selection of a gene replacement event, according to previously published procedures [40]. The first step involved cloning of the *ssuA* gene into the pUC4 plasmid after PCR amplification with primers FssuA2Nde28a (5' GCGCA-TATGGCCGAGCCGCGCA 3') and RssuA2Hind28a (5'GCGAAGCTTTCATTGCTCACC 3') (the *NdeI* and *HindIII* restriction sites are underlined). Inactivation of the *ssuA* gene was achieved by cloning a 2 kb gene cassette derived from *SmaI*-cleaved pHP45omega and encoding resistance to spectinomycin/streptomycin [41] into the single *KpnI* cleavage site within the *ssuA* gene. A clone carrying an inactivated copy of the *ssuA* gene (*ssuA::sp/sm*) was selected and confirmed by restriction analysis and automatic DNA sequencing. The mutated copy of the *ssuA* gene was released for the next cloning step by cleavage with *NdeI* and *NsiI* restriction enzymes. The mutated *ssuA::sp/sm* gene was cloned into the suicide pNPTS138 vector (originally constructed by D. Alley and kindly supplied by Dr. M. V. Marques of the Department of Microbiology, University of São Paulo). The pNPTS138 plasmid permits selection of single chromosomal integrations after plating transformed cells on plates containing kanamycin and subsequent selection of gene replacement events after a second selection round in media containing sucrose (because the plasmid carries a *sacB* gene that confers sensitivity to

sucrose) and spectinomycin [41]. The recombinant plasmid was named pNssuA and introduced by electroporation into the *X.citri* 306 strain as previously described [40]. Initial selection for the gene replacement event was carried out on plates containing kanamycin, followed by overnight growth of selected colonies in nonselective media and subsequent plating on 3% sucrose and 50 µg/ml spectinomycin to screen for cells that had undergone a second crossover event leading to excision of the plasmid carrying the wild type *ssuA* copy. PCR with primers FssuA2Nde28a and RssuA2Hind28a was used to confirm chromosomal deletions.

Construction of the expression vector for complementation of the *Xac::ssuA* mutant. A fragment containing a 900 base pairs upstream of the XAC3200 gene from *ssu* operon was amplified by PCR using primers FssuSall-p (5' CCAGAAACG-CATTCATGACCTC 3') and RssuEcoRI-p (5' CAGCCGATA-CAAAGGACGTCA 3'). This fragment contained the promoter sequence, which was cloned into the pKX33 vector [42] for construction of the pKX33-p. The full *ssuA* gene (1026 bp) was amplified from *X. citri* genomic DNA by PCR using the primers FssuA-EcoRIc (5' GAATTCATGCGGGCAACGGGCAGG 3') e RssuA-XbaIc (5' TCTAGATCATTTGCTCACCGCCTGCG 3') and cloned in to the pKX33 with the promoter sequence to build the pKX33-*ssuA* vector for expression in *X. citri* cells. The final plasmid was confirmed after digestion with *Sall* and *XbaI* (Figure 6C) and automatic DNA sequencing. Competent cells of *Xac::ssuA* strain were transformed with the final vector pKX33-*ssuA* by electroporation followed by selection on LB plates with 50 µg/ml kanamycin. The cells are described as *Xac::ssuAc*.

Xanthan gum production. *X. citri* 306 strain, the isogenic *Xac::ssuA* mutant and the mutant complemented (*Xac::ssuAc*) were grown in LB medium for 24 h at 30°C under aerated conditions (200 rpm) and subjected to the protocol described by Vojnov and collaborators [14]. Kanamycin (50 µg/ml) was added to the cultures of the mutant and complementary strains.

Growth curves and plant infection experiments. In vitro growth of wild-type and mutant strains was performed in 10 ml M9 minimal medium and sulphur-free M9 minimal medium supplemented with different alkanesulphonates (MES, CHES, HEPES) as sulphur sources at 28°C. Samples were taken every 2 h for determination of the total number of viable cells. In vivo assays were performed as previously described [43]. Six-month-old plants of sweet orange (*C. sinensis*) were obtained from certified nurseries and kept in a growth room at 25–28°C with fluorescent light illumination. Leaf sectors were infiltrated with approximately 7×10^6 viable bacteria in a total volume of 0.3 ml. Bacterial cultures were prepared in LB without NaCl for 48 h at 28°C with shaking at 200 rpm and subsequently suspended in sterile water. The appearance of canker pustules and lesion phenotypes was monitored daily for 20 days. To follow the growth of the bacteria inside the plant tissue, leaves were infiltrated with 7×10^6 viable bacteria in 6 different sectors. Every other day, three circular sections 1 cm in diameter containing the bacterial infiltrates were macerated in water and diluted aliquots were plated on LB agar plates for determination of the number of viable bacteria.

Supporting Information

Table S1 Crystallisation conditions for *X. citri* SsuA. (DOCX)

Table S2 Ligand interactions formed by hydrogen bonds between *X. citri* SsuA and alkanesulphonates. (DOCX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AB LCSF CB. Performed the experiments: FA CTP MS DC AB. Analyzed the data: AB LCSF TLB VBG JB. Contributed reagents/materials/analysis tools: RF EO. Wrote the paper: AB LCSF.

References

- Kertesz MA (2001) Bacterial transporters for sulfate and organosulfur compounds. *Res Microbiol* 152: 279–290.
- Kertesz MA (1999) Riding the sulfur cycle – metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 24: 135–175.
- Van der Ploeg JR, Eichorn E, Leisinger T (2001) Sulfonate-sulfur metabolism and its regulation in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* 176: 1–8.
- Autry AR, Fitzgerald JW (1990) Sulfonate S – a major form of forest soil organic sulfur. *Biol Fertil Soils* 10: 50–56.
- van der Ploeg JR, Weiss MA, Saller E, Nashimoto H, Saito N, et al. (1996) Identification of sulfate starvation-regulated genes in *Escherichia coli*: a gene cluster involved in the utilization of taurine as a sulfur source. *J Bacteriol* 178: 5438–5446.
- van der Ploeg JR, Cummings NJ, Leisinger T, Connerton IF (1998) *Bacillus subtilis* genes for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates. *Microbiology* 144: 2555–2561.
- Van der Ploeg JR, Iwanicka-Nowicka R, Bykowski T, Hryniewicz MM, Leisinger T (1999) The *Escherichia coli* *ssuEADCB* gene cluster is required for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates and is regulated by the transcriptional activator Cbl1. *J Biol Chem* 274: 29358–29365.
- Beale J, Lee SY, Iwata S, Beis K (2010) Structure of the aliphatic sulfonate-binding protein SsuA from *Escherichia coli*. *Acta Cryst Section F* 66: 391–396.
- Kahnert A, Vermeij P, Wietek C, James P, Leisinger T, et al. (2000) The *ssu* locus play a key role in organosulfur metabolism in *Pseudomonas putida* S-313. *J Bacteriol* 182: 2869–2878.
- Parkinson N, Aritua V, Heeney J, Cowie C, Bew J, et al. (2007) Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 2881–2887.
- Ryan RP, Vorholter EJ, Potnis N, Jones JB, Van Sluys MA, et al. (2011) Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nature Rev Microbiol* 9: 344–355.
- Gottwald TR, Graham JH, Civerolo EL, Barret HC, Hearn CJ (1993) Differential host range reaction of citrus and citrus relatives to citrus canker and citrus bacterial spot determined by leaf mesophyll susceptibility. *Plant Dis* 77:1004–1009.
- Brunings AM, Gabriel DW (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol Plant Pathol* 4: 141–157.
- Vojnov AA, Zorreguieta A, Dow JM, Daniels MJ, Dankert M (1998) Evidence for a role for the *gumB* and *gumC* gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. *Microbiology* 144: 1487–1493.
- Crossman L, Dow JM (2004) Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. *Microbes Infect* 6: 623–629.
- Guo Y, Sagaram US, Kim JS, Wang N (2010) Requirement of the *galU* gene for polysaccharide production by and pathogenicity and growth in planta of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Appl Environ Microbiol* 76: 2234–2242.
- Cooke AM (1998) Sulfonated surfactants and related compounds: facets of their desulfonation by aerobic and anaerobic bacteria. *Tenside Surface Deterg* 35: 52–56.
- Eichhorn E, van der Ploeg JR, Leisinger T (2000) Deletion analysis of the *Escherichia coli* taurine and alkanesulfonate transport systems. *J Bacteriol* 182: 2687–2795.
- He JJ, Quiocho FA (1993) Dominant role of local dipoles in stabilizing uncompensated charges on a sulfate sequestered in a periplasmic active transport protein. *Protein Sci* 2: 1643–7.
- Wang Z, Luecke H, Yao N, Quiocho FA (1997) A low energy short hydrogen bond in very high resolution structures of protein receptor-phosphate complexes. *Nat Struct Biol* 4: 519–22.
- Koropatkin NM, Pakrasi HB, Smith TJ (2006) Atomic structure of a nitrate-binding protein crucial for photosynthetic productivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9820–9825.
- Kopriva S, Koprivova A (2004) Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: the past, the present, and the future. *J Exp Bot* 55: 1775–83.
- Denny TP (1995) Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 33: 173–97.
- Rigano LA, Siciliano F, Enrique J, Sendin L, Filippone P, et al. (2007) Biofilm Formation, Epiphytic Fitness, and Canker Development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol Plant-Microbe Inter* 20: 1222–1230.
- Kemp BP, Horne J, Bryant A, Cooper RM (2004) *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* *gumD* gene is essential for EPS production and pathogenicity and

- enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*). *Physiol Mol Plant Pathol* 64: 209–218.
26. Vanderslice RW, Doherty DH, Capage MA, Betlach MR, Hassler RA, et al. (1989) Genetic engineering of polysaccharide structure in *Xanthomonas campestris*. In: Crescenzi V, Dea ICM, Paoletti S, Stivala SS, Sutherland IW, eds. *Biomedical and Biotechnological Advances in Industrial Polysaccharides*. New York: Gordon and Breach Science Publishers. pp 145–156. 35.
 27. Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd. ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
 28. Thompson DG, Higgins JD, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680.
 29. Saitou N, Nei M (1997) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 12: 406–425.
 30. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol Biol and Evol* 28: 2731–2739.
 31. Edelhoch H (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6: 1948–1954.
 32. Deleage G, Geourjon C (1993) An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum. *Comp Appl Biosc* 2: 197–199.
 33. Polikarpov I, Oliva G, Castellano EE, Garratt RC, Arruda P, et al. (1998) The protein crystallography beamline at LNLS, the Brazilian National Synchrotron Light Source. *Nucl Instrum Methods Phys Res A* 405: 159–164.
 34. Kabsch W (1988) Evaluation of single-crystal X-ray diffraction data from a position-sensitive detector. *J Appl Cryst* 21: 916–924.
 35. Collaborative computational project, number 4 (1994) The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst D* 50: 760–763.
 36. Vonrhein C, Blanc E, Roversi P, Bricogne G (2007) Automated structure solution with autoSHARP. *Methods Mol Biol* 364: 215–30.
 37. Sheldrick GM (2008) A short history of SHELX. *Acta Cryst A* 64: 112–122.
 38. Lamzin VS, Perrakis A, Wilson KS (2001) The ARP/WARP suite for automated construction and refinement of protein models. In *Int. Tables for Crystallography*. Vol. F: Crystallography of biological macromolecules (Rossmann, M.G. & Arnold, E. eds.), Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 720–722.
 39. Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ (1997) Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Cryst D* 53: 240–255.
 40. Oshiro EE, Nepomuceno RSL, Faria JB, Ferreira LCS, Ferreira RCC (2006) Site-directed gene replacement of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Microb Meth* 65: 171–179.
 41. Prentki P, Krisch HM (1984) In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 3: 303–313.
 42. Baldini RL, Tahara ST, Rosato YB (1999) A rolling-circle miniplasmid of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*: the nucleotide sequence and its use as a cloning vector. *Plasmid* 42: 126–33.
 43. Cernadas RA, Camillo LR, Benedetti CE (2008) Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolia*. *Mol Plant Pathol* 9: 609–31.

ANEXO 04- Declaração Isenção de Comitê de Ética

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **782/2015** referente ao projeto intitulado: "*Estudos funcionais e estruturais sobre o transportador do tipo ABC de sulfato em Xanthomonas axonopodis pv. citri*" sob a responsabilidade de Cristiane Tambascia Pereira e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Andrea Balan Fernandes**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 25 de novembro de 2015

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo M. A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

ANEXO 05 - Declaração de Direitos Autoriais**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Estudos Funcionais e Estruturais sobre o Transportador de Sulfato em Xanthomonas citri**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 28 de Outubro de 2017

Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Cristiane Tambascia Pereira**
RG n.º 35.117.066-2

Assinatura : _____

Nome do(a) orientador(a): **Andrea Balan Fernandes**
RG n.º 18.361.330-2